

50 376  
1978  
184

N° d'ordre : 414

50376  
1978  
184

# THÈSE

présentée

A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

le grade de Docteur ès-Sciences

par

**GÉRARD BRÛLÉ**

Maitre-Assistant

## ÉTUDE

# DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DE LA FIBRE MUSCULAIRE SQUELETTIQUE DE CRABE (*Carcinus mænas*)

Soutenue le 7 Juin 1978 devant la Commission d'Examen

M. CHAPMAN,	Professeur à l'Université de LEICESTER
M. GIRARDIER,	Professeur à l'Université de GENÈVE
M. GUILBAULT,	Professeur à l'Université de LILLE I
M. KREMBEL,	Professeur à l'Université de LILLE I
M. LEOTY,	Docteur à l'Université de POITIERS
M. MONTREUIL,	Professeur à l'Université de LILLE I

---

Travail réalisé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire  
de l'Université des Sciences et Techniques de Lille

209000-1HAVA

AVANT - PROPOS

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Physiologie Cellulaire de l'Université des Sciences et Techniques de LILLE, sous la direction de Monsieur le Professeur GUILBAULT qui a bien voulu m'accueillir dans son Laboratoire et me confier cette recherche. Que Monsieur le Professeur GUILBAULT veuille bien trouver ici le témoignage de mon entière gratitude pour la constante attention qu'il a manifestée à mon égard, la confiance et les conseils qu'il m'a prodigués tout au long de cette étude.

Je remercie vivement Monsieur le Professeur MONTREUIL qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon Jury. Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de mon profond respect et de ma sincère admiration.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur CHAPMAN, Monsieur le Professeur GIRARDIER, Monsieur le Docteur LÉOTY d'avoir accepté, malgré leurs nombreuses tâches, de consacrer leur temps et leur compétence à l'examen de mon travail, ainsi que Monsieur le Professeur KREMBEL qui a bien voulu, en outre, me guider et m'accueillir dans son Laboratoire pour la réalisation des dosages concernant l'activité ATPasique.

Je remercie également tous mes collègues, les membres du Laboratoire et ceux qui ont permis la réalisation de cette thèse ; tout particulièrement :

Monsieur HAUDECOEUR pour son dévouement, sa gentillesse permanente et sa collaboration efficace ;

Madame PORCHET et Monsieur DELORME pour leur aide précieuse en microscopie électronique ;

Monsieur DISSOUS pour ses conseils, son aide amicale et spontanée lors des mesures de l'activité ATPasique ;



Mademoiselle LEFEVRE, Madame BENSIGNOR-WIMET et Monsieur COISNE  
pour leur active participation technique ;

Mesdemoiselles BOISON et FILLOUCAT et Mesdames DESCAMPS et  
PLANCQ pour la dactylographie et, particulièrement, Madame COISNE  
qui en a assuré une partie, en plus de son propre travail, avec  
beaucoup de gentillesse.

G. B.

Villeneuve d'Ascq, Mai 1978

REVUE 23

10.9

villemur

## TABLE DES ABREVIATIONS

A	: Actine
ADP	: Adénosine diphosphate
ATP	: Adénosine triphosphate
$\text{CH}_3 \text{CH}_2 \text{COO}^-$	: Ions propionate
$\text{CH}_3 \text{O SO}_3^-$	: Ions méthylsulfate
[ ] <sub>e</sub>	: Concentration extracellulaire
[ ] <sub>en</sub>	: Concentration extracellulaire normale
[ ] <sub>i</sub>	: Concentration intracellulaire
$E_{\text{Cl}}$	: Pile aux ions chlorure
EDTA	: Acide éthylène diaminotétracétique
EGTA	: Acide éthylèneglycol-bis- ( $\beta$ -aminoéthyl ether) N, N'-tétracétique
$E_{\text{K}}$	: Pile aux ions potassium
$l_0$	: longueur d'équilibre de la fibre
M	: Myosine
Mb	: membrane
M.R.	: Milieu de référence
PA	: Potentiel d'action
pCa	: $-\log [\text{Ca}^{++}]$
Pe	: Périopode
Pi	: Phosphore inorganique
PM (ou MP)	: Potentiel de membrane
R.S.	: Reticulum sarcoplasmique
$T_{\text{AI}}$	: Système tubulaire transverse au niveau de la jonction bande A- bande I
TCA	: Acide trichloracétique
$\text{TEA}^+$	: Ions tétraéthylammonium
$T.\text{Li}^+$	: Tension mécanique développée en présence d'ions $\text{Li}^+$
TM	: Tropomyosine
$T.\text{Na}^+$	: Tension mécanique développée en présence d'ions $\text{Na}^+$
TN-C	: "Troponin - calcium - binding subunit"
TN-I	: "Troponin - inhibiting subunit"
TN-T	: "Tropomyosin - binding subunit"
Tris	: Tris- (hydroxy-méthyl) aminométhane
$T_Z$	: Système tubulaire transverse au niveau de la strie Z.



SOMMAIRE



	Pages
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : MATERIEL EXPERIMENTAL	5
I - PREPARATION DE LA FIBRE ISOLEE	7
II - STRUCTURE	7
CHAPITRE II : ACTIVITE ATPASIQUE DES MYOFIBRILLES ISOLEES	15
I - POSITION DU PROBLEME	17
II - TECHNIQUES	20
1 - Préparation des myofibrilles isolées de crabe	20
2 - Pureté des protéines de structure : contrôle en microscopie électronique	21
3 - Dosage spectrophotométrique des protéines	22
4 - Détermination de l'activité ATPasique par l'intermédiaire de l'hydrolyse de l'ATP : Dosage du Pi	25
III - STANDARDISATION DES RESULTATS	28
1 - Conditions de référence	28
2 - Choix du temps de contact des protéines de structure avec la solution de référence	28
3 - Choix de la concentration en protéines de structure et en substrat	30
4 - Contrôle biochimique de la pureté	34
5 - Effets de la force ionique et de l'activité des ions	35
IV - EFFETS PROPRES DES IONS SUR L'ACTIVITÉ ATPASIQUE	38
1 - Effets des ions divalents	38
1.1. Effets du $Ca^{++}$	
1.2. Effets du $Mg^{++}$	
2 - Effets des ions monovalents	42
V - CONCLUSION	49



## CHAPITRE III : ACTIVITE MECANIQUE DES MYOFIBRILLES DE CRABE 51

I - POSITION DU PROBLEME	52
II - TECHNIQUES	58
III - RESULTATS	66
1 - Effets de la concentration en ATP sur la concentration des myofilaments	66
2 - Effets de la concentration en ions sur la contraction des myofilaments	70
2.1. Effets propres des ions divalents	72
2.2. Effets propres des cations monovalents et des anions	80
2.2.1. Effets des cations monovalents à $[Cl^-]$ normale	80
2.2.2. Effets des ions $K^+$ à $[Cl^-] \times 2$	89
2.2.3. Effets des anions	91
IV - CORRELATION ENTRE L'ACTIVITE ATPasique ET L'ACTIVITE MECANIQUE DES MYOFILAMENTS - CONCLUSION	95

## CHAPITRE IV : CONTRACTURE POTASSIQUE ET POTENTIEL DE MEMBRANE 99

I - INTRODUCTION	101
II - TECHNIQUES	105
III - RESULTATS ET DISCUSSION	106
1 - Contracture de référence	106
2 - Effets de l'environnement en ions divalents	113
2.1. Influence des ions $Mg^{++}$	115
2.2. Influence des ions $Ca^{++}$	118
2.3. Conclusion	121
3 - Effets de l'absence de $Na^+$ . Importance sur les tensions mécaniques en milieu riche en $Ca^{++}$	123
3.1. Effets de l'absence de $Na^+$ sur la relation : Tension $f [K^+] e$	124
3.2. Influence de l'absence de $Na^+$ sur la concentration optimale externe de $Ca^{++}$ permettant l'activation maximale	127
3.3. Conclusion	132



4 - Effets du TEA et de la variation de la concentration de $\text{Cl}^-$ sur la contracture potassique et la dépolarisation.	133
4.1. Effets du TEA sur le couturier de grenouille	134
4.2. Effets du TEA sur la fibre musculaire de crabe à concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$ normale	137
4.3. Effets du TEA sur la fibre musculaire de crabe à concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$ réduite	141
4.4. Comparaison des effets du TEA sur la fibre musculaire de grenouille et sur celle de crabe.	146
Conclusion	
5 - Influence de la concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$ sur la contracture potassique et le potentiel de membrane de la fibre isolée en présence de concentrations variées en ions $\text{Na}^+$ et $\text{Ca}^{++}$	150
5.1. Influence de la concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$	151
5.2. Influence de l'ion $\text{Na}^+$ en milieu pauvre en $\text{Cl}^-$	157
5.3. Influence de l'absence de $\text{Ca}^{++}$ en milieu pauvre en $\text{Cl}^-$	161
5.4. Influence de la substitution du $\text{Cl}^-$ par le $\text{NO}_3^-$	163
5.5. Conclusion	165
6 - Mise en évidence de deux composantes au courant entrant et analyse du décours de la contracture	167
6.1. Existence de deux composantes en présence de $\text{Na}^+$	170
6.2. Evolution des composantes de la contracture et du potentiel de membrane en milieu $\text{Li}^+$	174
6.3. Evolution des deux composantes en milieu dépourvu de $\text{Ca}^{++}$	178
6.4. Evolution des deux composantes en milieu $\text{Sr}^{++}$	183
7 - Conclusion sur le phénomène de contracture	190

## CHAPITRE V : ETUDE DE LA SECOUSSE MUSCULAIRE 193

### I - POSITION DU PROBLEME ET CONSIDERATIONS GENERALES 195



II - TECHNIQUES	195
III - RESULTATS ET DISCUSSION	197
1 - Influence des ions $Ca^{++}$	200
2 - Influence des ions $Mg^{++}$	204
3 - Conclusion	209
CONCLUSION GENERALE	211
I - ACTIVITÉ $ATP_{Pasique}$	213
II - CONTRACTION DES MYOFILAMENTS	215
III - CONTRACTURE	218
RESUME	225
BIBLIOGRAPHIE	227



INTRODUCTION

Les différents évènements responsables du couplage excitation-contraction des fibres musculaires striées squelettiques sont connus dans leurs lignes principales. Néanmoins, certains mécanismes restent encore du domaine de l'hypothèse. Deux phases essentielles peuvent cependant être distinguées lors de ce couplage : la première concerne le couplage électrocalcique, celle correspondant aux différents évènements compris entre l'excitation et la libération du  $Ca^{++}$  par les réservoirs internes ; la seconde, concerne le couplage mécano-chimique constituant la phase finale, elle correspond aux évènements impliqués dans le développement du phénomène mécanique.

Il faut toutefois préciser, dès à présent, qu'en ce qui concerne le travail présenté ici, le problème de la relaxation n'a pas été abordé et en particulier celui concernant la reprise du  $Ca^{++}$  libéré par le reticulum sarcoplasmique ; seule est abordée la phase de contraction. Cependant, pour une étude satisfaisante du couplage entre l'excitation et le développement de la contraction résultante, au niveau de la fibre musculaire striée squelettique de crabe, il était nécessaire de bien connaître la structure de la préparation. Aussi, des études ultrastructurales récentes (DELORME et coll., 1978 ; voir chapitre I), effectuées en condition de référence et en condition d'hypertonie, ont-elles beaucoup apporté à une plus ample connaissance de la relation structure-fonction et ont conduit à préciser le rôle des "jonctions de couplage". En effet, l'altération unique de l'organisation structurale de cette "jonction" (hypertonie par apport d'urée) suffit à supprimer le phénomène de contraction sans pour autant inhiber le phénomène électrique (DELORME et coll., 1978).

Au niveau de cette préparation, l'étude des propriétés électriques de repos, du potentiel d'action et des courants membranaires ont fait l'objet de nombreuses études dans notre laboratoire et ont abouti à la présentation de deux mémoires de thèse (MOUNIER, 1975 ; HAUDECOEUR, 1975). Aussi, ce mémoire porte-t-il tout particulièrement sur les phénomènes mécaniques, l'évolution du potentiel membranaire, ainsi que l'activité ATPasique des protéines de structure, de manière à aboutir à une meilleure compréhension du couplage excitation-contraction.

L'étude de la relation liant le potentiel d'action à la secousse résultante étant encore plus mal aisée au niveau de la fibre squelettique du crustacé qu'au niveau de celle de la fibre squelettique de vertébrés (poly-innervation de la préparation, potentiel d'action non autorégénératif...), c'est la raison pour laquelle une faible partie de ce mémoire (chapitre V) est consacrée à cette relation. Une part beaucoup plus importante est par contre réservée à la contracture produite par un accroissement soudain d'ions  $K^+$  dans le milieu extracellulaire (chapitre IV). Il est, en effet, possible dans ces conditions d'enregistrer simultanément avec le phénomène mécanique, le phénomène électrique de décours plus simple que le potentiel d'action. Dans ces conditions, l'étude systématique des effets des modifications de l'environnement ionique a été entreprise, et permet ainsi, non seulement de confirmer le rôle primordial des ions  $Ca^{++}$  dans le couplage, mais aussi de montrer l'importance des ions  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  et  $Cl^-$ , et celle d'un courant entrant à deux composantes dont l'une, inhibée par les ions  $Mn^{++}$ , est portée par les ions  $Ca^{++}$ . L'hypothèse que ce courant de  $Ca^{++}$  permette par ailleurs la libération de  $Ca^{++}$  par le reticulum sarcoplasmique peut être émise et, la possibilité d'un couplage direct peut être envisagée. Enfin, pour une meilleure interprétation des mécanismes du couplage excitation-contraction compte tenu de la présence d'abondants systèmes membranaires, il importait de connaître le rôle de l'ensemble de ces membranes sur les mouvements des ions entraînant ainsi d'éventuelles variations ioniques intracellulaires. Aussi, une étude complémentaire a été entreprise, à savoir la contraction des myofilaments isolés, débarrassés des systèmes membranaires, lors d'apports d'ATP, de  $Ca^{++}$  et de  $Mg^{++}$  dans le milieu environnant (chapitre III). Cette étude permet en effet de rendre compte de certains résultats difficilement interprétables dans le cadre de l'étude des contractures potassiques. Dans le même ordre d'idée, il s'est avéré indispensable de procéder à l'étude de l'activité ATPasique des protéines de structure en relation avec leur environnement ionique (chapitre II).

Dans un but de clarification pour la présentation des résultats, et de leurs interprétations, le présent mémoire est subdivisé en quatre parties qui concernent donc :

- 1°) l'activité ATPasique des protéines de structure ;

- 2°) l'activité mécanique des myofibrilles isolées ;
- 3°) les contractures potassiques et l'évolution du potentiel membranaire ;
- 4°) la secousse musculaire.

Enfin, une dernière partie concerne la conclusion générale des différents résultats présentés et discutés au fur et à mesure de leur énoncé. Cette conclusion conduit à l'élaboration d'un schéma cybernétique du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique striée du crabe Carcinus maenas.



CHARLES

1911

CHAPITRE I

MATERIEL EXPERIMENTAL

I - PREPARATION DE LA FIBRE ISOLEE

II - STRUCTURE

## I - PREPARATION DE LA FIBRE ISOLÉE

L'animal d'expérience, le crabe enragé, Carcinus maenas, provient des côtes de la région du Nord, fourni par l'Institut de Biologie marine de Wimereux et par le Laboratoire maritime de Luc-sur-Mer. Il est conservé en vie au Laboratoire dans une eau de mer régulièrement renouvelée et maintenue à basse température (de l'ordre de 10° C).

Les fibres musculaires utilisées proviennent du méropodite de l'une des pattes locomotrices (Fig. 1). La section des deux arêtes de la carapace permet l'accès aux fibres musculaires. Pour l'ensemble des préparations, les fibres sont isolées dans la partie du méropodite juxtaposée au basiischiopodite. En fait dans cette zone les fibres sont plus longues. Toutefois, la longueur de ces fibres, tout comme leur diamètre, varie selon les crabes et les périopodes utilisés (Pe<sub>1</sub>, Pe<sub>2</sub> ou Pe<sub>3</sub>) ; variation de 3000 à 10000  $\mu$  en ce qui concerne leur longueur et de 75 à 400  $\mu$  en ce qui concerne leur diamètre. La fibre musculaire est isolée après section des fibres avoisinantes ainsi que des nombreux filets nerveux attestant de la poly-innervation des fibres de crustacés (DORAI RAJ, 1964 ; FAHRENBACH, 1967 ; HOYLE et WIERSMA, 1958 ; ATWOOD et coll., 1965 entre autres). Cette fibre isolée (Fig. 2) est attachée d'un côté à la carapace et de l'autre à une partie d'endosquelette : l'axostyle. La fibre est finalement isolée en sectionnant la carapace autour du niveau d'attache et de part et d'autre de l'attache du côté axostyle. La dissection est effectuée dans le liquide physiologique dont la composition en mM est donnée par FATT et KATZ (1953) soit : NaCl : 513 ; KCl : 12,9 ; CaCl<sub>2</sub> : 11,8 ; MgCl<sub>2</sub> : 23,6 ; CO<sub>3</sub>HNa : 2,6. La fibre, une fois isolée, est placée dans une petite cuve (contenance : 1 ml) remplie de ce liquide physiologique constamment renouvelé de pH 7,8 et dont la pression osmotique est équivalente à celle d'une solution contenant 1163 milliosmoles.

## II - STRUCTURE

La fibre a la particularité de présenter d'abondantes invaginations longitudinales du sarcolemme (KÖLLIKER, 1866 ; RUTHERFORD, 1897 ; PEACHEY, 1966, 1967), et présente de plus, par rapport aux fibres de vertébrés, un double système tubulaire transverse : l'un situé à l'aplomb



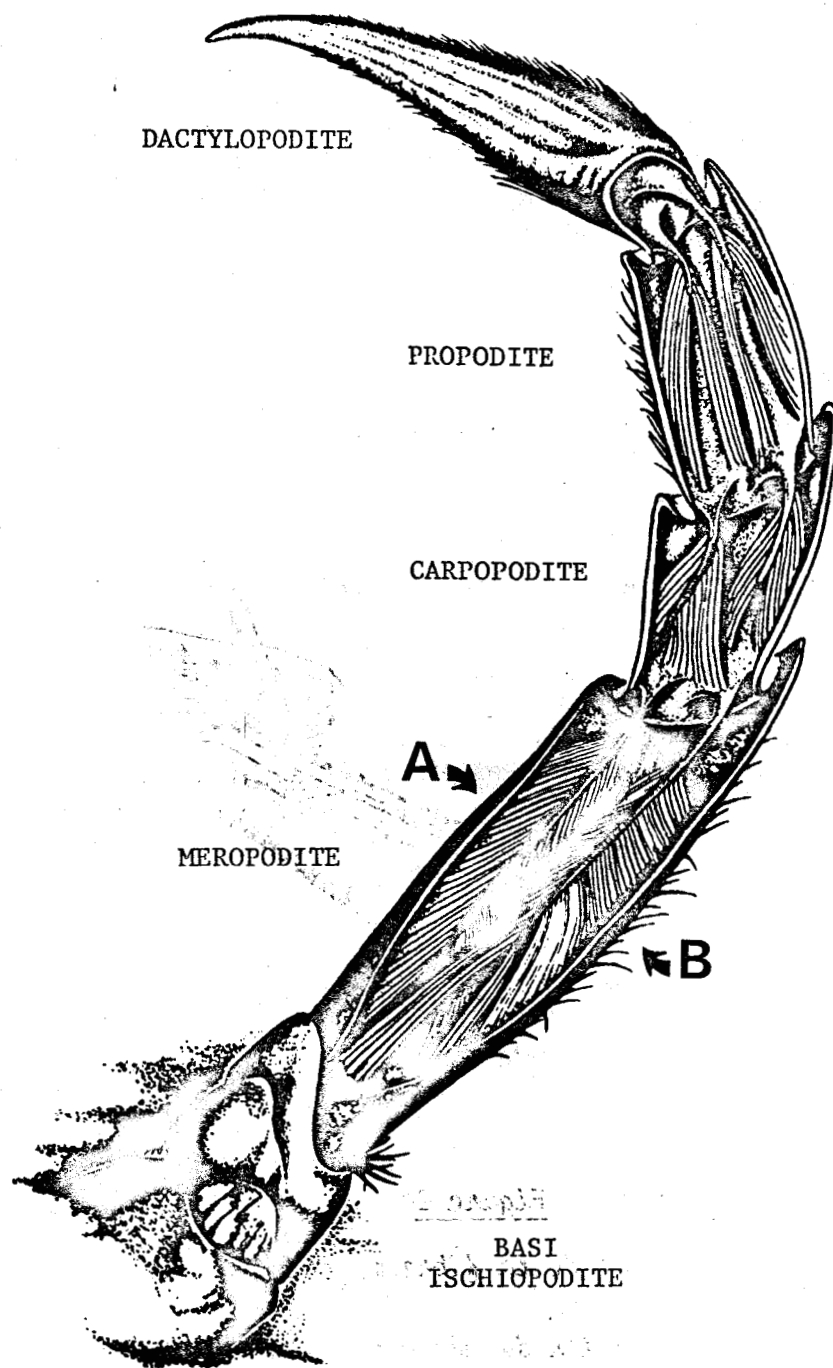


Figure 1.

Schéma de la musculature du périopode Pe de crabe.

La section de la carapace est effectuée selon les arêtes A et B. Les fibres se présentent alors disposées parallèlement en différents faisceaux et sont insérées à leurs extrémités sur la carapace (exo-squelette) d'une part et sur une lame calcaire, l'axostyle (endo-squelette) d'autre part.

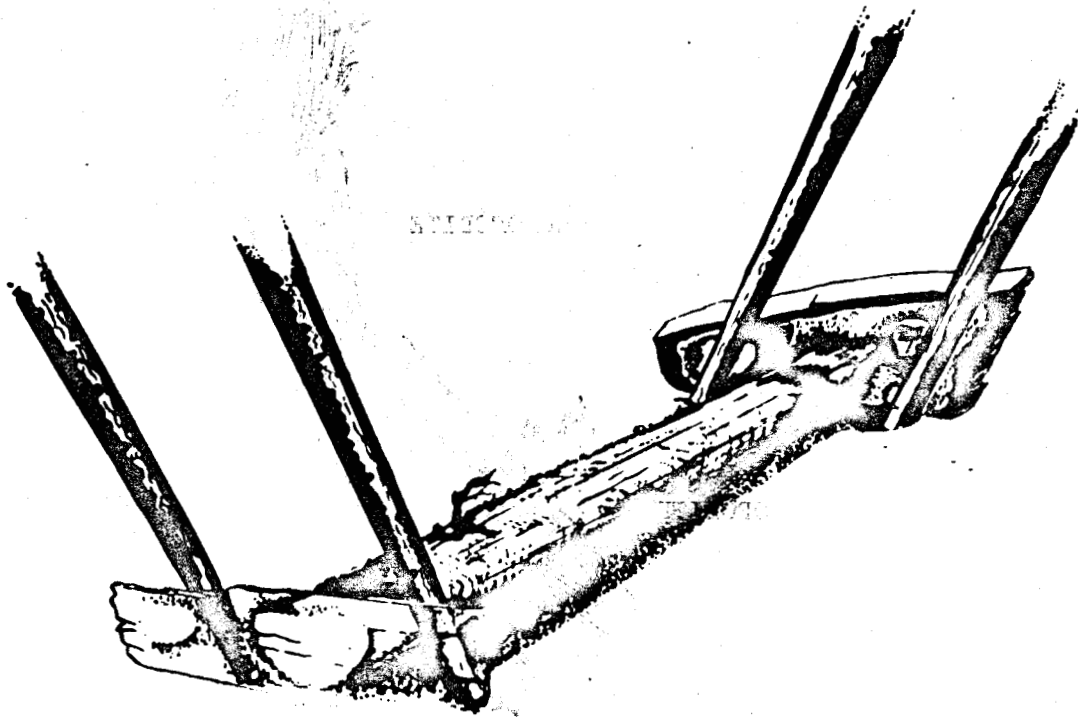
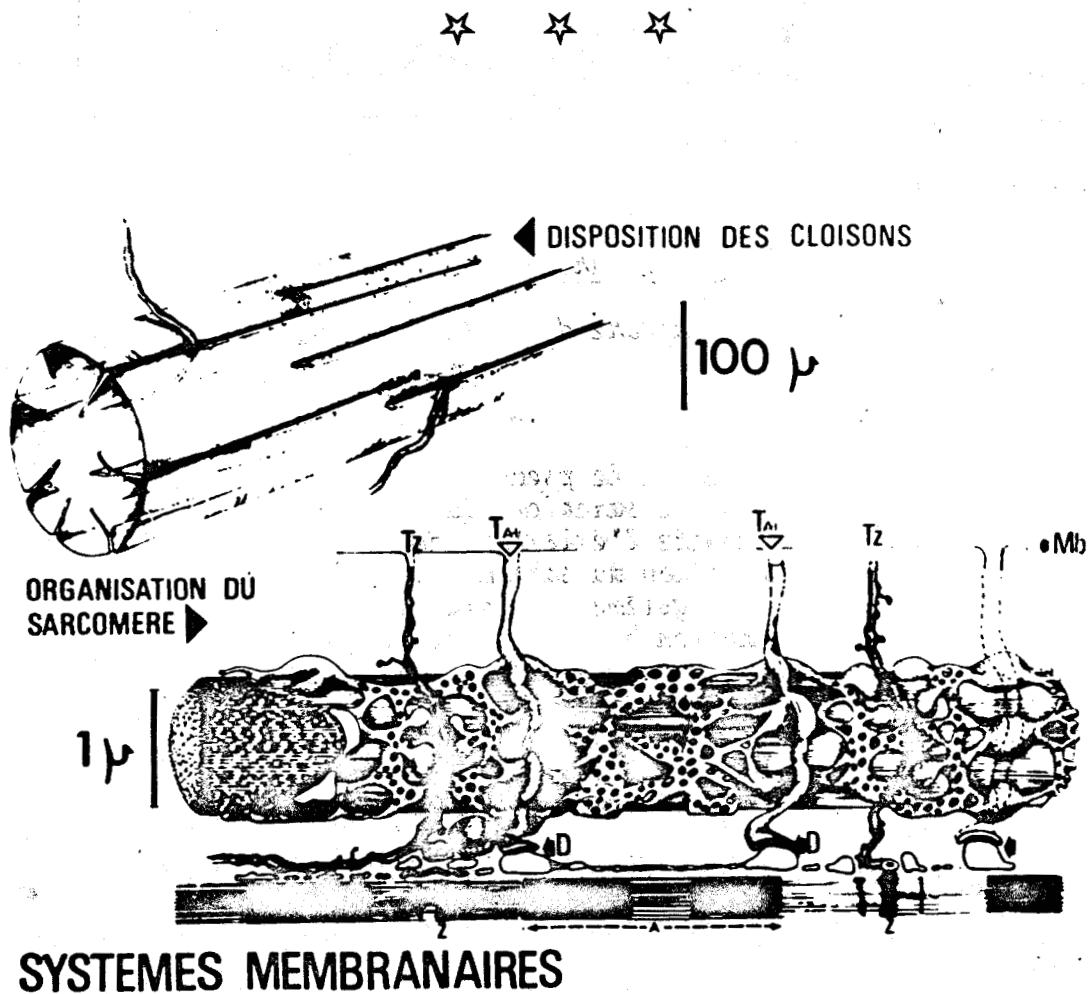


Figure 2

Aspect morphologique de la fibre musculaire striée squelettique de crabe.

La fibre est isolée à partir du mēropodite de l'une des pattes locomotrices du crabe et maintenue dans du liquide physiologique de référence (eau de mer artificielle) dont la composition, en mM, donnée par FATT et KATZ (1953) est la suivante :  $\text{Na}^+$  = 515,6 ;  $\text{K}^+$  = 12,9 ;  $\text{Ca}^{++}$  = 11,8 ;  $\text{Mg}^{++}$  = 23,6 ;  $\text{Cl}^-$  = 596,7 ;  $\text{CO}_3\text{H}^-$  = 2,6.

de la strie Z, dénommé  $T_z$  ; l'autre, au niveau de jonction bande A - bande I et dénommé  $T_{AI}$ , lequel présente des contacts diadiques, caractéristiques des crustacés, avec les citernes terminales du reticulum sarcoplasmique (Fig. 3 d'après MATHIEU, 1970 ; PEACHEY et HUXLEY, 1964 ; PEACHEY, 1967 ; ATWOOD, 1971). Toutefois, une étude ultrastructurale récente (DELORME et coll., 1978) de cette préparation montre (Fig. 4), outre l'extrême richesse du système tubulaire, des contacts diadiques avec les citernes du R.S. à tous niveaux et notamment au niveau des gros tubes  $T_z$  dans des régions proches de la membrane sarcolemmique. Ainsi le rôle unique de soutien donné à ces tubes  $T_z$  par PEACHEY (1965, 1967) doit être complété dans la mesure où à son niveau la présence de contacts diadiques est observée. Le rôle exercé par ce système  $T_z$  pourrait concerner également celui relatif au couplage excitation-contraction.





1816  
Figure 3

*Structure et ultrastructure de la fibre musculaire de crabe.*

(d'après MATHIEU, 1970)

Le schéma du haut montre le pseudo-cloisonnement de la fibre par invagination de la membrane sarcolemmique.

Le schéma du bas montre l'existence du double système tubulaire transverse et l'organisation du sarcomère.

- T<sub>A1</sub> représente le système tubulaire transverse, localisé au niveau de la jonction bande A-bande I, qui forme des diades (D) au contact des renflements (citernes terminales) du reticulum sarcoplasmique longitudinal qui entoure les myofilaments.
- T<sub>Z</sub> représente le système tubulaire transverse, localisé au niveau de la strie Z, qui contourne les myofibrilles de surface et se subdivise en longeant les myofilaments plus internes.

BUS  
LILLE



BUS  
LILLE

Figure 4

Ultrastructure de la fibre musculaire striée squelettique de crabe, observée : A, en coupe transversale, B, en coupe longitudinale.

Ces photographies montrent l'abondance du système tubulaire (T) et l'existence de contacts diadiques (D) entre ces tubules (T et Tt) et les citernes du reticulum sarcoplasmique (R), constituant les jonctions de couplage.

La coupe transversale permet de montrer l'invagination de la membrane sarcolemmique et l'existence de diades (flèche) au niveau d'un tube de grand diamètre.

A : bande A ; AI : extrémité de la bande A ; B : basale ;  
E : épine du tube T ; I : bande I ; M : mitochondrie ;  
Z : ligne Z.

Grossissement : A = 12 500 ; B = 25 000

(Dû à l'obligeance du Professeur P. DELORME)



CHAPITRE I I

ACTIVITE ATPASIQUE DES MYOFIBRILLES ISOLEES



## I - POSITION DU PROBLEME

## II - TECHNIQUES

- 1 - Préparation des myofibrilles isolées de crabe
- 2 - Pureté des protéines de structure : contrôle en microscopie électronique
- 3 - Dosage spectrophotométrique des protéines
- 4 - Détermination de l'activité ATPasique par l'intermédiaire de l'hydrolyse de l'ATP : dosage du Pi.

## III - STANDARDISATION DES RESULTATS

- 1 - Conditions de référence
- 2 - Choix du temps de contact des protéines de structure avec la solution de référence
- 3 - Choix de la concentration en protéines de structure et en substrat
- 4 - Contrôle biochimique de la pureté
- 5 - Effets de la force ionique et de l'activité des ions

## IV - EFFETS PROPRES DES IONS SUR L'ACTIVITÉ ATPASIQUE

- 1 - Effets des ions divalents
  - 1.1. Effets du  $\text{Ca}^{++}$
  - 1.2. Effets du  $\text{Mg}^{++}$
- 2 - Effets des ions monovalents

## V - CONCLUSION

## I - POSITION DU PROBLEME

De nombreuses revues sur la biochimie des protéines contractiles et la base moléculaire de la contraction ont été publiées (DREIZEN, 1971 ; TAYLOR, 1972 ; HARRINGTON, 1972 ; LOWY, 1972 ; TONOMURA et OOSAWA, 1972 ; WEBER et MURRAY, 1973 ; FUCHS, 1974). La contraction des muscles striés qui requiert la combinaison de protéines (myosine et actine) localisées au niveau des filaments gros et fins, est morphologiquement équivalente au glissement de ces filaments organisés au niveau du sarcomère (SZENT-GYÖRGYI, 1951 ; HASSELBACH, 1953 ; HUXLEY et HANSON, 1957 ; HANSON et HUXLEY, 1957 ; HUXLEY, 1957). Ce glissement mutuel est réalisé grâce à l'interaction des filaments d'actine et de myosine, lesquels activent le clivage de l'ATP en ADP et Pi (HUXLEY, 1969).

La première évidence du rôle joué par le  $Ca^{++}$  dans la régulation de la contraction et de la relaxation a été donnée par les travaux de HEILBRUNN et WIERCINSKI (1947) ; depuis, l'importance de cet ion est rapportée dans de nombreuses revues parmi lesquelles citons SANDOW, 1965, 1970 ; FUCHS, 1974 ; SZENT-GYÖRGYI, 1975 ; EBASHI, 1976. Toutefois, la sensibilité du système à l'ion  $Ca^{++}$  n'est pas la propriété intrinsèque de l'interaction entre l'actine, la myosine et l'ATP, mais nécessite la présence d'autres protéines de nature régulatrice (EBASHI, 1968). Ces protéines régulatrices consistent en tropomyosine et troponine (EBASHI et ENDO, 1968). Le rôle de la troponine dans la régulation, par le  $Ca^{++}$ , de la contraction a été vu en détail au niveau des muscles striés de vertébrés (EBASHI et ENDO, 1968 ; EBASHI et coll., 1968 ; FUCHS et BRIGGS, 1968 ; WEBER et MURRAY, 1973 ; POTTER et coll., 1976 ; DABROWSKA et SZPACENKO, 1977). Ainsi, la troponine extraite du lapin est composée de 3 sous-unités (GREASER et GERGELY, 1971). La TN-I ("Troponin-inhibiting-subunit") inhibe l'interaction de l'actine et de la myosine à la fois en présence et en absence de  $Ca^{++}$  (PERRY et coll., 1972 ; EBASHI et coll., 1972 ; GREASER et coll., 1972 ; HARTSHORNE et DREIZEN, 1972). La TN-C ("calcium-binding subunit") correspondant à la troponine A décrite par HARTSHORNE et MUELLER (1968) est le fragment qui présente une haute affinité pour le  $Ca^{++}$  (GREASER et coll., 1972 ; GREASER et GERGELY, 1973) et qui, en présence de  $Ca^{++}$ , supprime l'inhibition de l'ATPase (ATP Phosphorylase) induite par le TN-I (HARTSHORNE et DREIZEN, 1972 ; PERRY et coll., 1972 ; voir WEBER

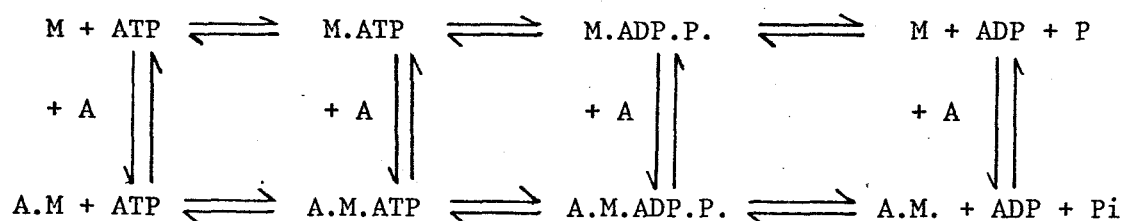


et MURRAY, 1973). La troponine B correspond en fait essentiellement à la TN-I et à la TN-C (WILKINSON, 1974). La TN-C lie, ainsi, le  $Ca^{++}$  libéré, du reticulum sarcoplasmique, après stimulation entraînant ainsi un déplacement relatif de la tropomyosine par rapport à l'actine, et permettant l'hydrolyse de l'ATP (KRETSINGER et BARRY, 1975). La TN-T ("Tropomyosin-binding subunit") présente, quant à elle, un rôle structural et permet la liaison de la troponine à la tropomyosine et est ainsi nécessaire au contrôle de la régulation du  $Ca^{++}$  (GREASER et GERGELY, 1973 ; DRABIKOWSKI et coll., 1972).

Quant à la tropomyosine, isolée par BAILEY (1948), dont la molécule consiste en 2 chaînes polypeptidiques sous forme de deux hélices (WOODS, 1966 ; COHEN et coll., 1971 ; LONGLEY, 1975 ; PARRY, 1975, entre autres), elle s'étend tout au long du filament d'actine, tandis que la troponine n'est présente qu'à intervalles de 400 Å environ (voir GILLIS, 1975). Elle influence notamment l'interaction entre le complexe actine-myosine (actomyosine) et le Mg-ATP (DANKER, 1970). De plus, des études de cinétique montrent bien que le complexe troponine-tropomyosine inhibe l'ATPase de la myosine activée par l'actine, à travers un blocage des sites activateurs des filaments d'actine (EISENBERG et KIELLEY, 1970 ; PARKER, PYUN et HARTSHORNE, 1970).

Les fibres musculaires des pattes de crabe, Carcinus maenas, comme celles de la plupart des décapodes présentent un type de régulation lié à l'actine (LEHMAN et SZENT-GYÖRGYI, 1975). Certains muscles de homard présentent le même type de régulation alors que d'autres (muscles lents) présentent, en plus, un type de régulation lié à la myosine (REGENSTEIN et SZENT-GYÖRGYI, 1975 ; LEHMAN et SZENT-GYÖRGYI, 1975). Le type de régulation lié à l'actine est mis en évidence par un test basé sur le fait que le complexe troponine-tropomyosine réduit l'affinité de l'actine pour la myosine en absence de  $Ca^{++}$  (HARTSHORNE et PYUN, 1971 ; EISENBERG et KIELLEY, 1970) ; l'actine pure en excès active l'ATPase de l'actomyosine qui présente un système régulateur lié à l'actine, même en absence d'ions  $Ca^{++}$ . Toutefois, des études récentes montrent une régulation liée à la myosine dans de nombreux muscles de décapodes, sous des conditions ioniques physiologiques (LEHMAN, 1977).

Quant à la myosine, elle présente un site actif qui est constitué par la méromyosine lourde (HMM : "heavy meromyosin" ; voir MANNHERZ et GOODY, 1976). Une sous fraction de la LMM ("light meromyosin"), la LMM-1 agit comme inhibiteur des ATPases myofibrillaires, elle se trouve incluse dans la structure des filaments de myosine et agit sur les sites actifs de la myosine (KALAMKAROVA et coll., 1975). Toutefois, l'activité ATPasique de la myosine varie selon les différents animaux et pour les différents muscles ; ainsi, elle est plus faible dans les muscles squelettiques lents et cardiaques que dans les muscles squelettiques rapides (BAILEY, 1942 ; SEIDEL et coll., 1964 ; BARANY et coll., 1965 ; GERGELY et coll., 1965 ; KATZ et coll., 1966 ; voir SYROVY, 1975). Cependant, si cette myosine provoque une hydrolyse de l'ATP, son activité enzymatique est relativement faible. Par contre, si l'actine est additionnée au système, les deux protéines se combinent en formant l'actomyosine et l'hydrolyse est accrue (voir GILLIS, 1972, 1975). Quand l'ATP est additionné à un complexe d'actine et de HMM, la dissociation du complexe actine-HMM survient avant la libération de Pi (CHOCK, CHOCK et EISENBERG, 1976). Des travaux effectués à partir de fragments de myosine montrent que le taux maximum d'hydrolyse de l'ATP à une concentration infinie d'actine est suffisamment importante pour être en accord avec l'énergie libérée lors de la contraction du muscle (EISENBERG et MOOS, 1968, 1970 ; voir MANNHERZ et GOODY, 1976). Le  $\text{Ca}^{++}$  est connu comme cofacteur activant l'action enzymatique de l'actomyosine en hydrolysant l'ATP et libérant l'énergie pour la contraction (voir SANDOW, 1965). L'énergie libérée par l'hydrolyse de la molécule d'ATP conduit à un glissement des filaments fins d'actine par rapport aux gros filaments de myosine dans les sarcomères des myofibrilles musculaires (DAVYDOV, 1974). Les premières phases de l'hydrolyse du Mg-ATP par l'actomyosine (voir ci-dessous) ont été reportées par LYMN et TAYLOR (1971), LYMN (1974)



(A = actine ; M = myosine).



Dans le muscle au repos, lorsque l'interaction avec l'actine est bloquée, 90 p. 100 de la myosine se trouve présente sous forme de complexe intermédiaire myosine-ADP.P et 10 p. 100 sous forme de myosine ATP (WEBER et MURRAY, 1973). MARSTON et TREGGAR (1972) trouvent qu'au niveau des fibres musculaires glycélinées, le nucléotide lié est l'ADP. Le taux d'hydrolyse d'ATP par les myofibrilles au repos dépend de la stabilité du complexe myosine ADP.P. Toutefois, l'activité ATPasique, au niveau de ces différentes préparations, est montrée dépendre de nombreux facteurs tels que l'environnement ionique, le pH... (voir LEGER et coll., 1975 ; FUCHS, 1974 ; MANNHERZ et GOODY, 1976).

Ainsi, à partir de myofibrilles isolées de crabe, une étude de l'importance de cet environnement ionique au niveau de l'activité ATPasique peut être entreprise dans le but de rapporter cette activité au phénomène contractile et de ce fait d'élucider le couplage excitation-contraction.

## II - TECHNIQUES

### 1) Préparation des myofibrilles isolées de crabe

Les différentes fibres musculaires, prélevées comme cela a été décrit antérieurement, sont coupées en morceaux et placées ensuite dans un milieu KCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM. La technique de préparation des myofibrilles isolées dérive de celles décrites par PERRY et GREY en 1956 et HOTTA et BOWEN en 1970. Les fragments musculaires sont placés dans un "Potter" et homogénéisés dans un premier temps dans la solution KCl 0,1 M, Tris-HCl, à raison d'une dilution au 1/10, pendant 20 secondes à vitesse moyenne. L'ensemble est ensuite centrifugé à 0° C, à 900 tours/minute pendant 5 minutes. Le surnageant est alors éliminé, et le culot repris et dilué 10 fois dans la solution KCl 0,1 M, Tris-HCl. Une nouvelle homogénéisation est réalisée à vitesse rapide pendant 30 secondes à 0° C. L'homogénéisat est alors centrifugé à 0° C pendant 10 minutes à 1500 tours/minute. A la suite de cette opération, le surnageant est éliminé et le culot est cette fois dilué 10 fois dans la solution initiale (KCl 0,1 M, Tris-HCl 10 mM) additionnée de Triton X 100 (2,5 p. 100) et laissé pendant 1 heure à 0° C. L'utilisation d'un détergent non ionique tel que le Triton X 100 a pour but d'éliminer le reste éventuel de membrane mitochondriale ou

de reticulum sarcoplasmique ; les protéines contractiles n'étant pas inactivées par ce détergent (SOLARO, PANG et BRIGGS, 1971). De même, Mc FARLAND et INESI (1971) montrent que le Triton X 100 solubilise environ 80 p. 100 des protéines membranaires ainsi que l'ensemble des phospholipides membranaires du reticulum sarcoplasmique. Ces auteurs précisent par ailleurs que la fraction soluble renferme l'ATPase dépendant du  $Ca^{++}$  du reticulum sarcoplasmique. Toutefois, avant le dosage du Pi par la méthode de FISKE et SUBBAROW (1925), il est nécessaire de bien laver les myofibrilles. En effet, DULLEY (1975) met en évidence, en présence de détergent, la formation d'un précipité qui entraîne une perte de la couleur résultante lors du dosage. De fait, après avoir laissé les "myofibrilles" en présence de Triton X 100, l'ensemble est centrifugé à 1500 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant est alors éliminé et la partie supérieure du culot est diluée 5 fois dans la solution KCl 0,1 M, Tris-HCl ; trois lavages, séparés de centrifugation à 1000 tours/minute pendant 10 minutes, sont ensuite effectués dans ce milieu. Finalement, les suspensions de myofibrilles sont stockées à 0° C.

## 2) Pureté des protéines de structure : contrôle en microscopie électronique

La suspension de myofibrilles est centrifugée à 1500 tours/minute pendant 10 minutes. Le culot est alors repris et lavé deux fois de suite dans un tampon phosphate (pH = 7,2) afin d'éliminer le Tris, puis fixé dans un mélange glutaraldéhyde 1 % phosphate pendant 1 minute. L'étape suivante consiste en 2 lavages successifs dans le tampon phosphate avant la fixation pendant 1 heure dans le mélange acide osmique - tampon phosphate. La déshydratation s'effectue alors en passant successivement deux fois pendant 15 minutes dans différents bains d'alcool à 25°, 60°, 75°, 95° et 100° ; puis l'ensemble passe dans deux bains successifs d'oxyde de propylène pendant 30 minutes. Ensuite, la préparation est placée dans un mélange volume-volume d'oxyde de propylène et d'araldite pendant 1 heure avant d'être mise dans le mélange final d'araldite pendant 12 heures à 4° C. Enfin, après un passage d'une heure dans le mélange final à 20° C, la préparation est incluse définitivement et mise en étuve à 60° C pendant 3 jours. Le mélange final d'araldite renferme 1 volume d'araldite pour 1 volume de durcisseur auxquels sont ajoutées 12 gouttes d'accélérateur

pour 10 ml de mélange.

Les coupes fines ainsi que l'examen en microscopie électronique sont réalisées par le Docteur PORCHET (Laboratoire de Microscopie Electronique de l'Université). Les photos obtenues (Figs 5 et 6) montrent que la préparation est constituée uniquement de myofibrilles à l'exclusion de toutes structures membranaires. Une telle préparation peut donc être utilisée pour le dosage de l'activité ATPasique des myofibrilles en fonction de leur environnement ionique. Toutefois, de façon à maintenir des conditions standard, il importe de connaître la quantité de protéines de structure en suspension dans un volume déterminé.

### 3) Dosage spectrophotométrique des protéines

La quantité de protéines myofibrillaires présente en suspension est dosée par une méthode dérivée de celle de LOWRY et coll. (1951). Le dosage s'effectue de la façon suivante :

- 0,05 ml de la suspension myofibrillaire est mis en présence de 0,2 ml de NaOH N ; dès cet instant, il est nécessaire d'attendre une heure au minimum pour la solubilisation des protéines ;

- ensuite, 0,15 ml d'eau bidistillée sont ajoutés au mélange précédent ;

- puis, sont additionnés 2 ml d'une solution (D) qui consiste en un mélange de 50 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 2 p. 100 avec 1 ml d'une solution (B) préparée juste avant le dosage. Cette dernière solution renferme 1 volume de Cu SO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O à 1 p. 100 et 1 volume de tartrate double Na, K à 20 p. 100. Une attente de 10 minutes à température ambiante est nécessaire après l'addition de la solution D et avant l'addition de 0,2 ml de la solution commerciale de FOLIN (réactif de coloration) diluée à moitié. La lecture s'effectue ensuite, lorsque la coloration est établie en 1/2 heure à l'obscurité, au spectrophotomètre à 750 nm. Au préalable, avant chaque série de dosage, une courbe étalon (Fig. 7) est réalisée en partant d'une solution de B S A (Bovin Serum Albumine) à 500 γ /ml. De manière à conserver la même concentration ionique que pour la suspension de myofibrilles, la gamme étalon est réalisée en présence de 0,05 ml de KCl 0,1 M, Tris-HCl.



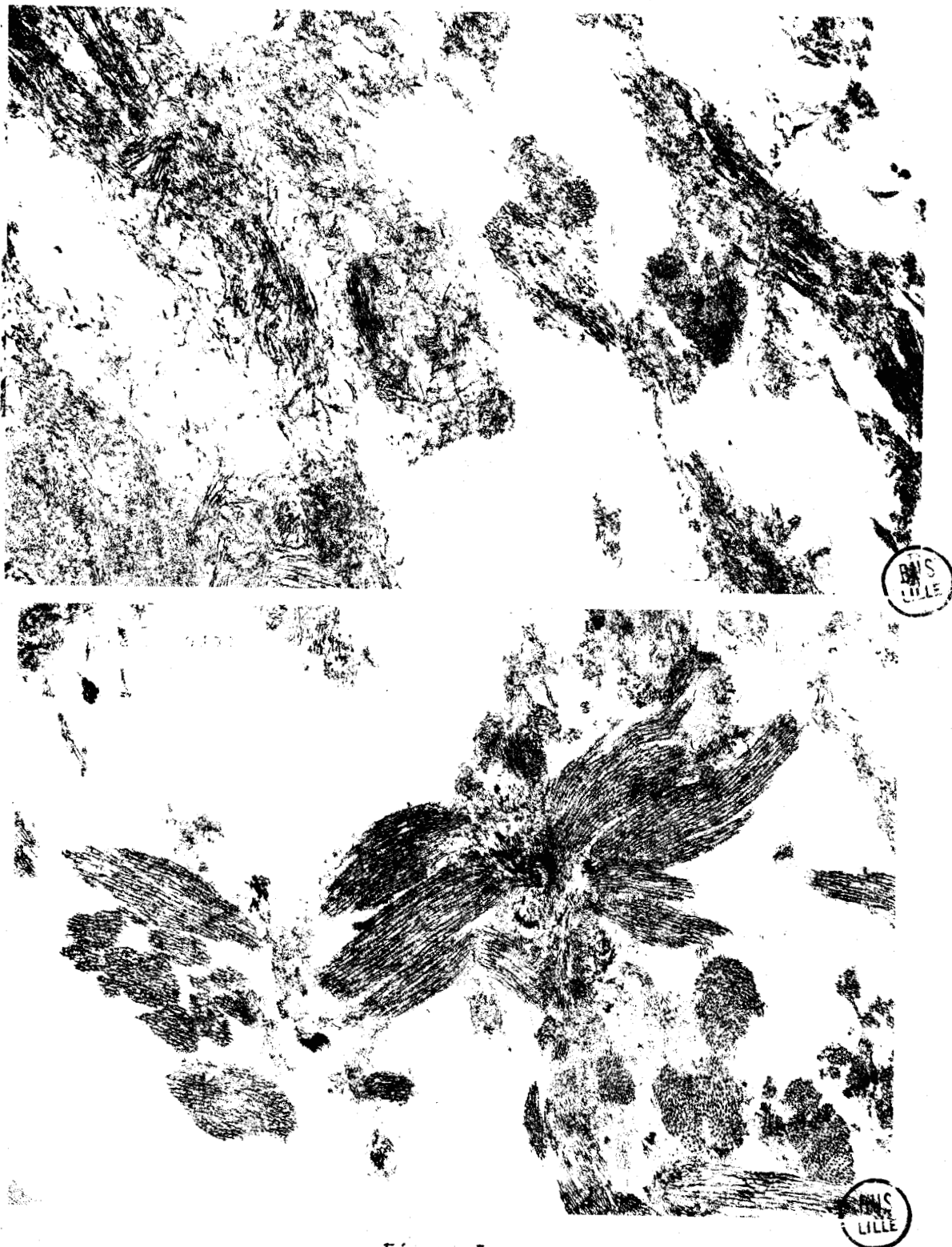


Figure 5

Examen en microscopie électronique des myofibrilles isolées de crabe, montrant l'absence de système membranaire au niveau de la préparation.

Grossissement : 6 000. Fixation glutaraldéhyde 1 p.100.  
 Les fibrilles restent pour la plupart regroupées en "paquet". Les plans de coupe montrent des myofibrilles en coupe longitudinale, oblique ou transversale.

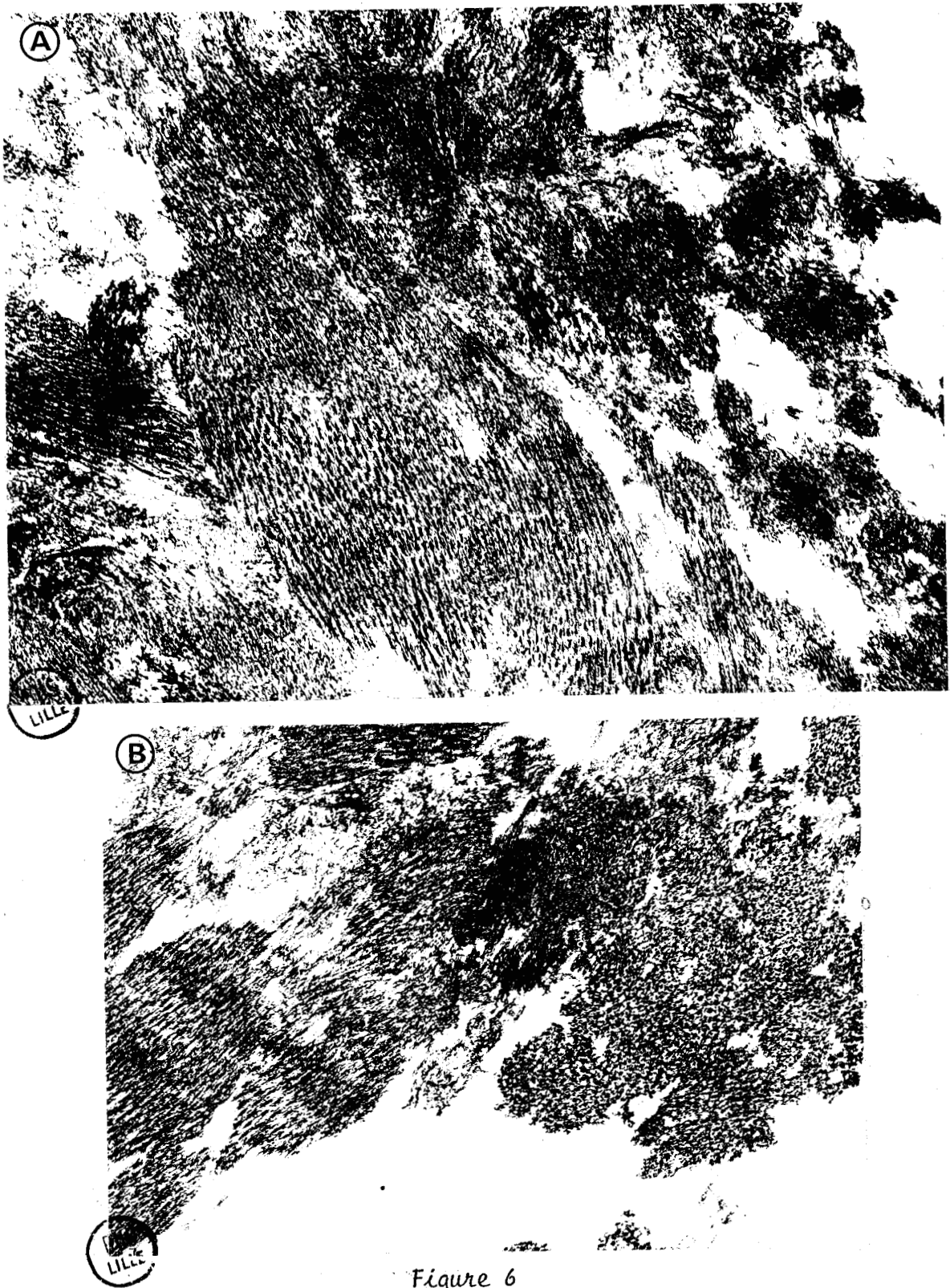


Figure 6

Examen en microscopie électronique des myofibrilles isolées de crabe.

Grossissement : A = 20 000, B = 25 000. Fixation glutaraldéhyde : 1 p.100.

Ces photographies révèlent l'absence de toute structure membranaire ainsi que le regroupement des myofibrilles.

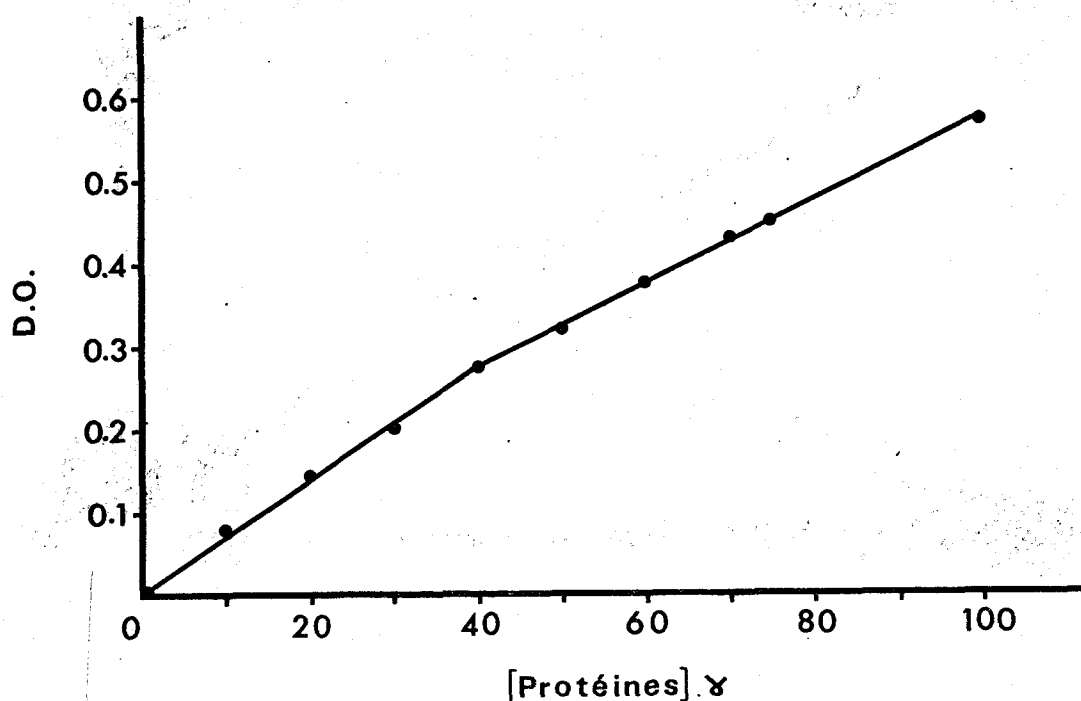


Figure 7

*Courbe étalon établie pour le dosage, par la méthode de LOWRY, des protéines à partir de BSA (Bovine Serum Albumine).*

*Evolution de la coloration exprimée en densité optique en fonction de la quantité de protéines se trouvant dans un volume final de 0,4 ml avant l'addition des solutions de coloration (conditions identiques à celles du dosage des protéines de structure). De façon à se placer dans des conditions parfaitement identiques à celles du dosage de ces protéines de structure, dans le volume de 0,4 ml sont inclus : KCl 0,1 M (0,05 ml) et NaOH 1 M (0,2 ml).*

4) Détermination de l'activité ATPasique par l'intermédiaire de l'hydrolyse de l'ATP : dosage du Pi

L'activité ATPasique de ces suspensions myofibrillaires est déterminée par la mesure de la quantité de Pi libérée en présence d'ions et d'ATP à des concentrations variées. Le dosage du Pi est réalisé de la façon suivante : 0,5 ml d'une solution de concentrations ioniques et d'ATP déterminées sont mis en présence de 0,4 ml de KCl 0,1 M, Tris-HCl ; à ce



mélange est alors additionné 0,1 ml de suspension de myofibrilles. La réaction s'effectue dans un bain marie à 20° C. Elle est ensuite stoppée par l'addition de 0,35 ml d'acide trichloracétique (TCA) à 20 p. 100, et l'ensemble est placé à 0° C puis centrifugé. Ce blocage de la réaction par l'acide TCA est efficace comme le montrent TONOMURA et INOUE (1974), SYROVY (1975) entre autres, pour l'étude des ATPases de la myosine. Pour les tubes témoin, l'acide TCA est additionné dès le début, avant même d'avoir introduit la suspension de myofibrilles afin d'empêcher l'hydrolyse de l'ATP. Dès lors, 1 ml de toutes les solutions à tester est prélevé et additionné de 0,1 ml d'eau bidistillée. La réaction de coloration s'effectue en ajoutant à ce mélange 0,2 ml de molybdate d'ammonium à 8,3 p. 100, puis 0,1 ml d'un mélange destructeur qui consiste en un regroupement de deux acides purs et concentrés (Volume-Volume) soit  $\text{HClO}_4$  et  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ; enfin la coloration est obtenue par l'addition de 0,2 ml d'une solution d'amidol à 1 p. 100 dans du sulfite de Na anhydre à 20 p. 100. Cette solution d'amidol est préparée avant chaque série de dosage et est laissée 30 minutes à l'obscurité avant d'être filtrée sur papier Wathman n° 1. La coloration s'établit alors progressivement en 1 heure à l'obscurité et le dosage du Pi s'effectue au spectrophotomètre à 725 nm. Au préalable, comme pour le dosage des protéines, une courbe étalon est établie en partant d'une solution de  $\text{K H}_2 \text{PO}_4$  anhydre (Fig. 8). L'ensemble des dosages a été réalisé au laboratoire de Biochimie moléculaire de l'Université (Professeurs KREMBEL et MONTREUIL) où il a été possible de disposer du matériel nécessaire et de l'aide indispensable.

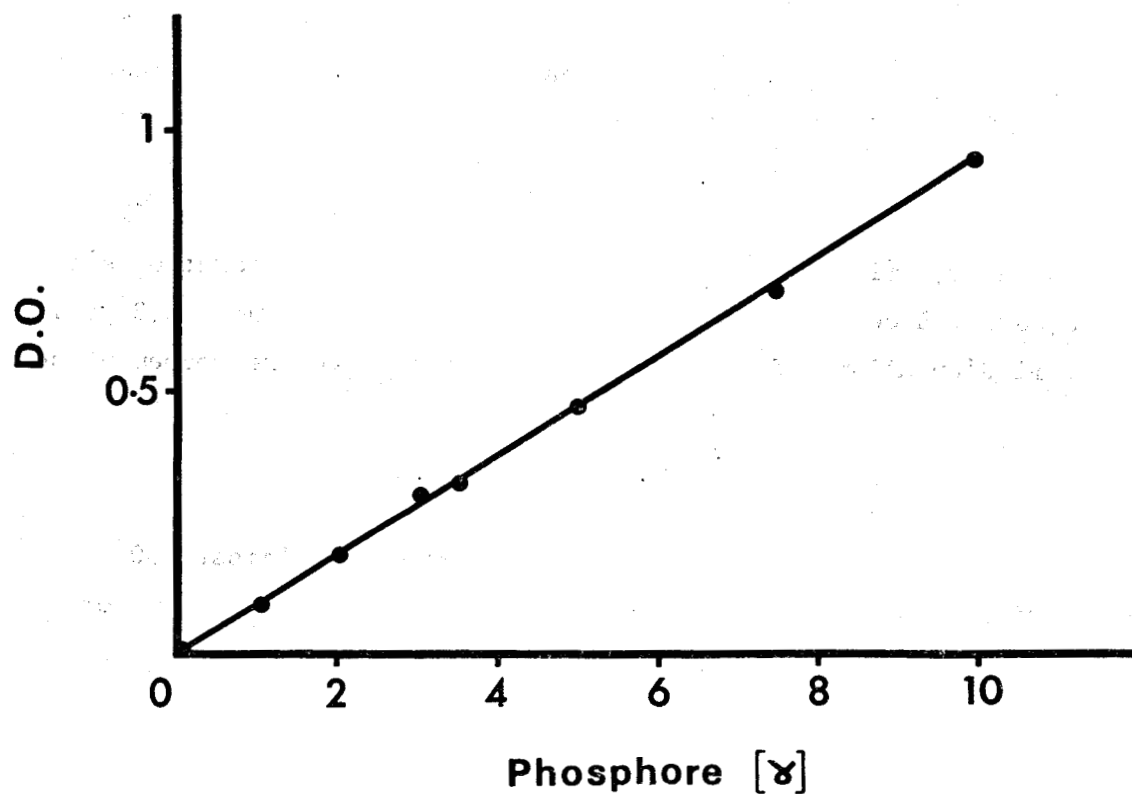


Figure 8

Courbe étalon établie pour le dosage spectrophotométrique du phosphore.

Evolution de la coloration exprimée en densité optique en fonction de la quantité de phosphore se trouvant, avant la coloration, dans un volume de 1,1 ml. La courbe est établie à partir d'une solution de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre.

### III - STANDARDISATION DES RESULTATS

#### 1) Conditions de référence

Comme cela a été indiqué antérieurement (dosage des protéines), les protéines de structure en suspension dans 0,5 ml de KCl 0,1 M - Tris HCl, sont mises en présence d'une solution de contenu ionique déterminé de façon à obtenir en conditions finales, au moment de l'hydrolyse de l'ATP, un milieu environnant sensiblement équivalent à celui du milieu interne dont la composition est celle proposée par PROSSER et BROWN (1962), à savoir en mM :  $\text{Na}^+$  = 54 ;  $\text{K}^+$  = 112 ;  $\text{Cl}^-$  = 54. Ici, du fait de la suspension en KCl 0,1 M, la concentration en  $\text{Cl}^-$  est de 76 mM, celle en  $\text{K}^+$  de 106. Les concentrations en  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  sont respectivement égales à 1 et 7 mM. La solution contenant de l'ATP (ATP disodique NBC, à concentration finale de 2 mM), tamponnée par du Tris-HCl (15 mM), a un pH compris entre 6,6 et 6,8.

#### 2) Choix du temps de contact des protéines de structure avec la solution de référence

Dans un premier temps, il était nécessaire de connaître l'évolution de l'activité ATPasique myofibrillaire en fonction du temps de réaction à 20° C dans le but d'obtenir un taux d'hydrolyse suffisant et constant. La courbe de la figure 9 montre que la quantité de Pi libérée lors de cette activité ATPasique est directement proportionnelle au temps de réaction pour des durées comprises entre 0 et 20 minutes. Au-delà, la réaction a tendance à diminuer et la quantité de Pi libéré est relativement moins importante. Ainsi, pour la suite des expériences, le temps moyen de 10 minutes a été retenu dans la mesure où il correspond au temps nécessaire à l'obtention du taux d'hydrolyse maximum. La quantité de Pi libéré est exprimée, pour une série d'expériences déterminées, en unités arbitraires (p. 100). Ce dosage a été effectué à partir d'une suspension myofibrillaire de 210  $\gamma$  pour 0,1 ml (2,1 g/l). Toutefois, l'activité ATPasique de telles préparations est relativement instable. Ainsi, chez un mollusque, AZUMA et coll. (1975) montrent que l'activité ATPasique de la myosine maintenue dans une solution de KCl 0,5 M à pH neutre et à 0° C est relativement instable et diminue de 10 à 20 p. 100 par jour. Aussi,



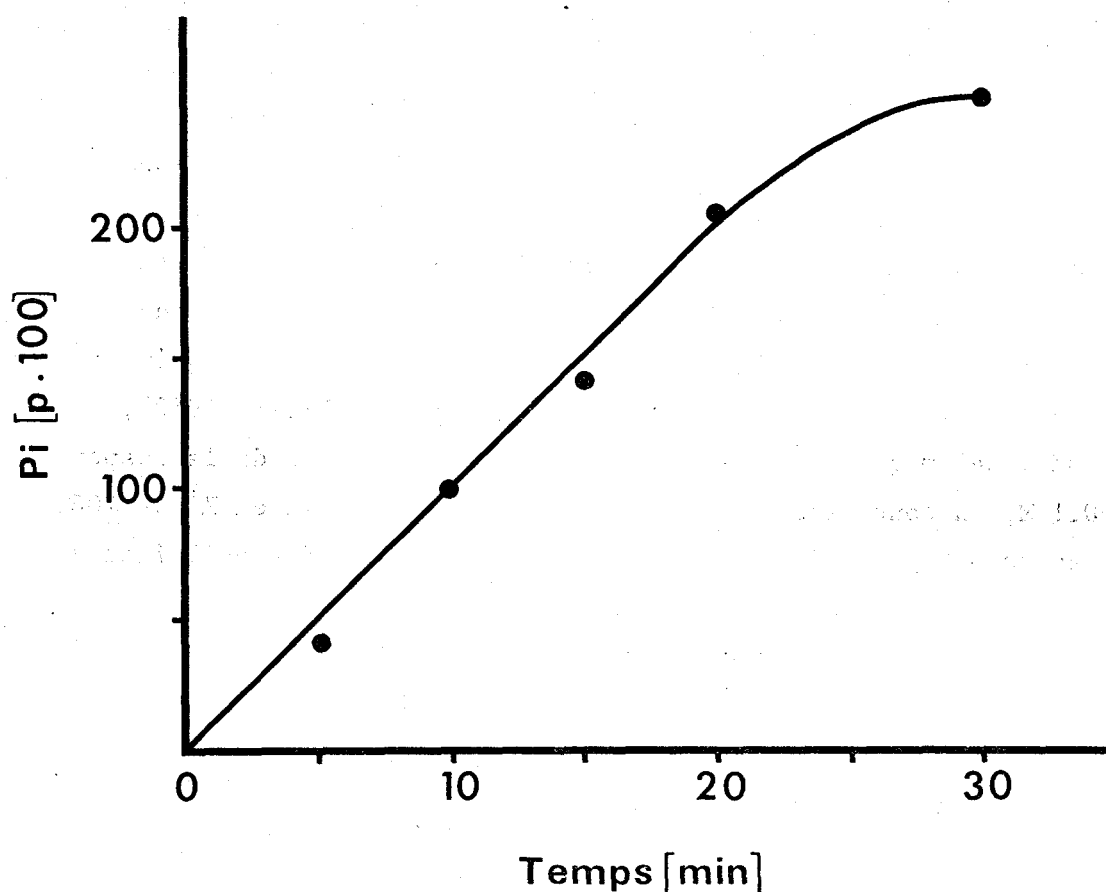


Figure 9

Quantité de Pi libéré au cours de l'hydrolyse de l'ATP par les myofilaments, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction du temps.

Les protéines myofibrillaires utilisées sont conservées en suspension, à la concentration de 210  $\gamma$  pour 0,1 ml, dans une solution de KCl 0,1 M. La valeur de référence 100 p.100 prise pour un temps de 10 minutes correspond à la quantité de Pi libéré pendant ces 10 mn, à 20°C, pour 210  $\gamma$  de protéines mises en présence du milieu renfermant l'ATP et se trouvant ainsi au moment de la réaction dans un volume de 1 ml.

La concentration des ions lors de l'hydrolyse est la suivante :  
 $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^{+} = 54 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^{+} = 106 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 2 \text{ mM}$  ;  
 $\text{Cl}^{-} = 76 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 22 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^{-} = 52 \text{ mM}$  ;  $\text{Tris HCl} = 15 \text{ mM}$  ;  
 La réaction est stoppée, en temps désiré, par addition d'acide trichloracétique.

est-ce la raison pour laquelle l'ensemble des dosages réalisés sur une préparation de suspensions de myofibrilles se fait sur une, voire deux journées, en prenant systématiquement pour chaque série des témoins. D'autre part, un des facteurs essentiels est de bien maintenir constant le pH des solutions utilisées dans la mesure où des variations de pH entraînent des modifications d'activité ATPasique. En effet, WOŁODKO et KAY (1975), étudiant l'activité ATPasique de la myosine cardiaque, montrent que pour la gamme des pH alcalins de 7,1 à 9,3, cette activité ATPasique est d'autant plus forte que le pH augmente. Toutefois, STRETER et coll. (1966), SEIDEL (1967), GUTH et SAMAHA (1969), SAMAHA et coll. (1970), SYROVY (1975) montrent que l'activité ATPasique de la myosine du muscle rapide est relativement stable en milieu alcalin alors que celle de la myosine du muscle lent et du muscle cardiaque est à l'inverse labile. Les ATPases myofibrillaires des muscles cardiaques et squelettiques sont également activées pour des gammes de pH compris entre 7,4 et 5. Toutefois, l'acidose diminue la sensibilité au  $\text{Ca}^{++}$  de l'ATPase myofibrillaire à la fois du muscle ventriculaire et du muscle gastrocnémien du lapin (KENTISH et NAYLER, 1976). Par contre, les activités  $\text{Mg}^{++}$  ATPasiques de l'actomyosine, de myofibrilles et de la myosine des muscles cardiaques et squelettiques sont activées par des pH alcalins et inhibées par une augmentation de la force ionique (voir LEGER et coll., 1975). Cette dépendance du pH est également observée au niveau de la myosine du muscle de mollusque par AZUMA et coll. (1975). Sur la fibre musculaire de crabe, DE VILLAFRANCA (1967) montre de même que l'activité ATPasique myofibrillaire est dépendante du pH et qu'il existe une inter-relation entre le pH et les activations  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  du système enzymatique. Cette corrélation est également précisée chez le crabe par PORTZEHL et coll. (1969). Ces auteurs précisent toutefois que sur leur préparation myofibrillaire de crabe, un changement de la valeur du pH de 6 à 8 n'entraîne qu'une très légère diminution de l'hydrolyse de l'ATP. La diminution du  $\text{Ca}^{++}$  requis pour la 1/2 activation apparaît être plus faible pour la gamme de pH de 6,5 à 7 que de 6 à 6,5 et de 7 à 8.

### 3) Choix de la concentration en protéines de structure et en substrat

Le pH des solutions utilisées étant maintenu par le tampon Tris-HCl à une valeur de 6,8 (valeur proche de celle trouvée par PAILLARD

(1972) pour le milieu intracellulaire de la fibre de crabe), le deuxième facteur important à déterminer concerne la concentration de protéines mises en réaction en présence de différentes quantités d'ATP pour des concentrations de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$  standard. De fait, il est connu que les concentrations d'enzyme et de substrat sont importantes. En effet, NIHEI et FILIPENKO (1975) montrent que l'activité ATPasique dépend de la quantité de myosine et de la quantité de substrat en réaction. La figure 10 montre, qu'au niveau des myofibrilles de crabe, l'activité ATPasique,

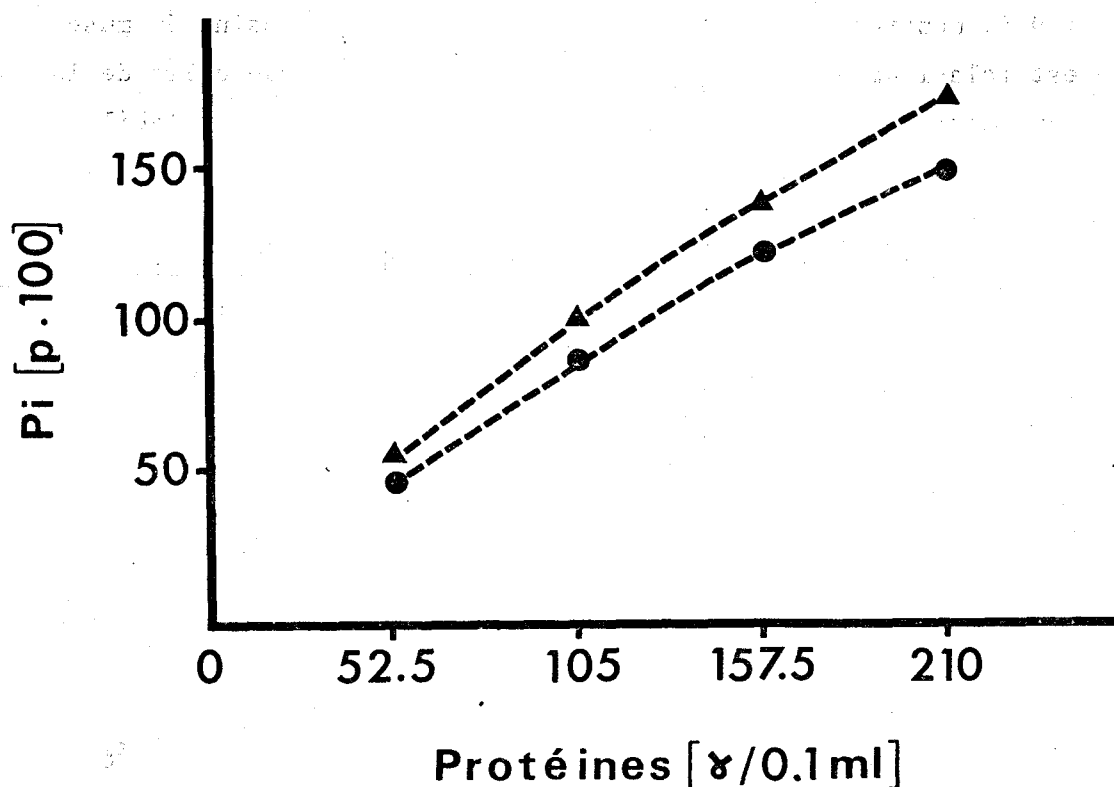


Figure 10

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de la quantité de protéines de structure présente dans la suspension initiale de 0,1 ml.

Les courbes sont établies pour un temps de réaction de 10 minutes et pour deux concentrations différentes d'ATP :  $\blacktriangle$  = 2 mM ;  $\bullet$  = 3 mM.

Les concentrations des autres ions en solution dans le milieu environnant les protéines de structure sont celles de référence, soit :  $\text{Ca}^{++}$  = 1 mM ;  $\text{Mg}^{++}$  = 7 mM ;  $\text{K}^+$  = 106 mM ;  $\text{Na}^+$  = 54 mM ;  $\text{Cl}^-$  = 76 mM ;  $\text{SO}_4^{--}$  = 22 mM ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$  = 52 mM ; Tris HCl = 15 mM.



exprimée en p. 100 de Pi libéré pendant 10 minutes, est sensiblement directement proportionnelle à la concentration de protéines pour des valeurs comprises entre 52,5  $\gamma$  et 210  $\gamma$  pour 0,1 ml de suspension initiale (0,52 et 2,10 g/l). Cette figure montre, de plus, que l'activité ATPasique dépend de la concentration en ATP.

La courbe exprimant la quantité de Pi libéré pendant 10 minutes en fonction de la concentration en protéines semble toutefois curvilinéaire, et, c'est la raison pour laquelle la concentration de protéines en suspension initiale sera prise égale à 1,05 g/l (105  $\gamma$  / 0,1 ml).

Les facteurs, temps de réaction (10 min.) et quantité de protéines (1,05 g/l), étant déterminés, l'influence du facteur concentration en substrat doit être analysée dans les conditions standard. Cette influence a d'ailleurs été vue par de nombreux auteurs, en particulier par DE VILLAFRANCA (1967) sur les myofibrilles de crabe ; il montre en effet l'importance de l'ATP et détermine un maximum d'activité, suivant le milieu, pour des valeurs de substrat comprises entre 2 et 6 mM. L'inhibition de l'activité survient pour des niveaux plus bas de substrat lorsque la concentration de  $Ca^{++}$  passe de 10 mM à 1 mM. Il apparaît aussi que l'inhibition survient à peu près pour une concentration en substrat égale à la concentration en ions divalents (DE VILLAFRANCA, 1967). De plus, FENNER et coll. (1973) montrent, sur leur préparation (myosine myocardique) que la concentration saturante d'ATP est de 4 mM lorsque le  $K^+$  est utilisé comme activateur alors que l'effet inhibiteur des concentrations supérieures en ATP est très faible pour l'enzyme activé par le  $Ca^{++}$ . Quoiqu'il en soit, de hautes concentrations en substrat inhibent l'ATPase myofibrillaire indépendamment de la présence d'ions divalents activateurs (PERRY et GREY, 1956 ; FINKEL et GERGELY, 1961 ; DE VILLAFRANCA, 1967). Cette inhibition de substrat décrite antérieurement par HASSELBACH (1952 a) est probablement due à l'ATP libre et elle se produit quand cette concentration d'ATP est supérieure à celle de  $CaCl_2$  (AVENA et BOWEN, 1971) pour la myosine du muscle squelettique comme à celle de  $MgCl_2$  (PERRY et GREY, 1956 ; voir LEGER et coll., 1975). De même, pour BOCHARNIKOVA et coll. (1974) le rôle du substrat dans la réaction ATPasique de la myosine peut être supporté à la fois par l'ATP et le complexe ATP-Ca. L'interaction compétitive entre ces deux substrats semble être la raison probable de l'inhibition de la réaction observée à haute concentration d'ATP. Pour ces auteurs, une dimi-

nution dans le degré du processus enzymatique serait également due à l'excès d'ATP libre par rapport à la concentration du complexe ATP-Ca.

Au niveau de notre préparation, la concentration en ATP au moment de la réaction influence directement la libération de Pi. En effet, la figure 11 indique que la concentration optimale en ATP est de 2 mM dans les conditions standard sans toutefois que l'inhibition par excès de

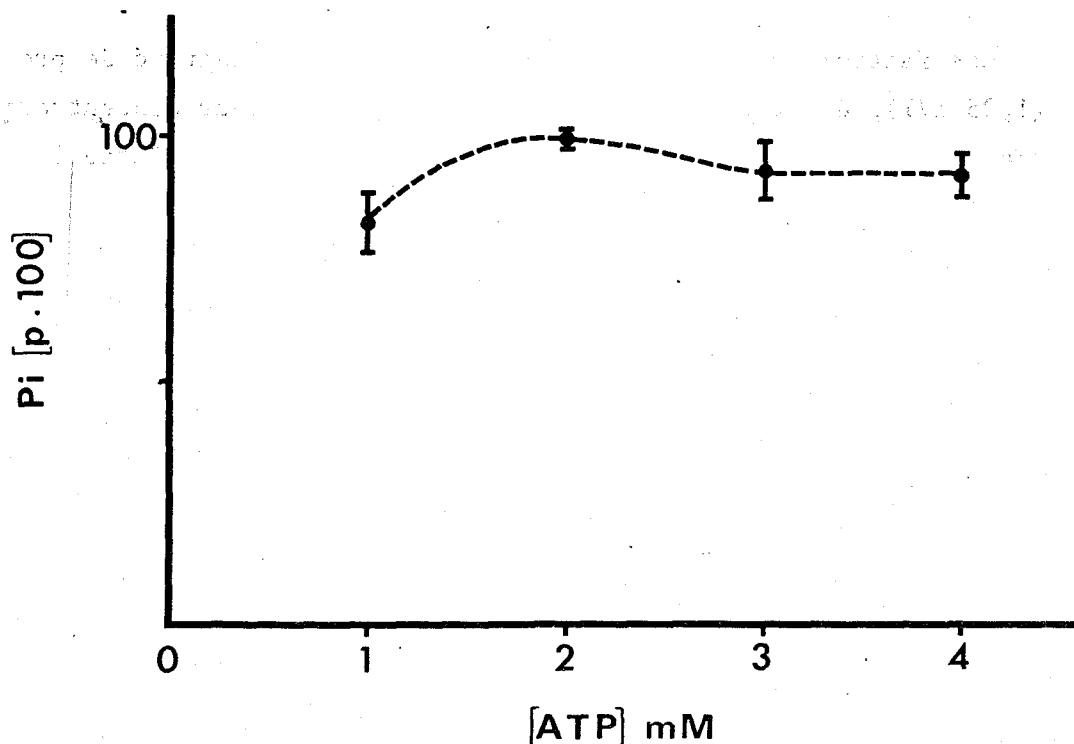


Figure 11

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de la concentration d'ATP, en mM, du milieu de réaction.

La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes.

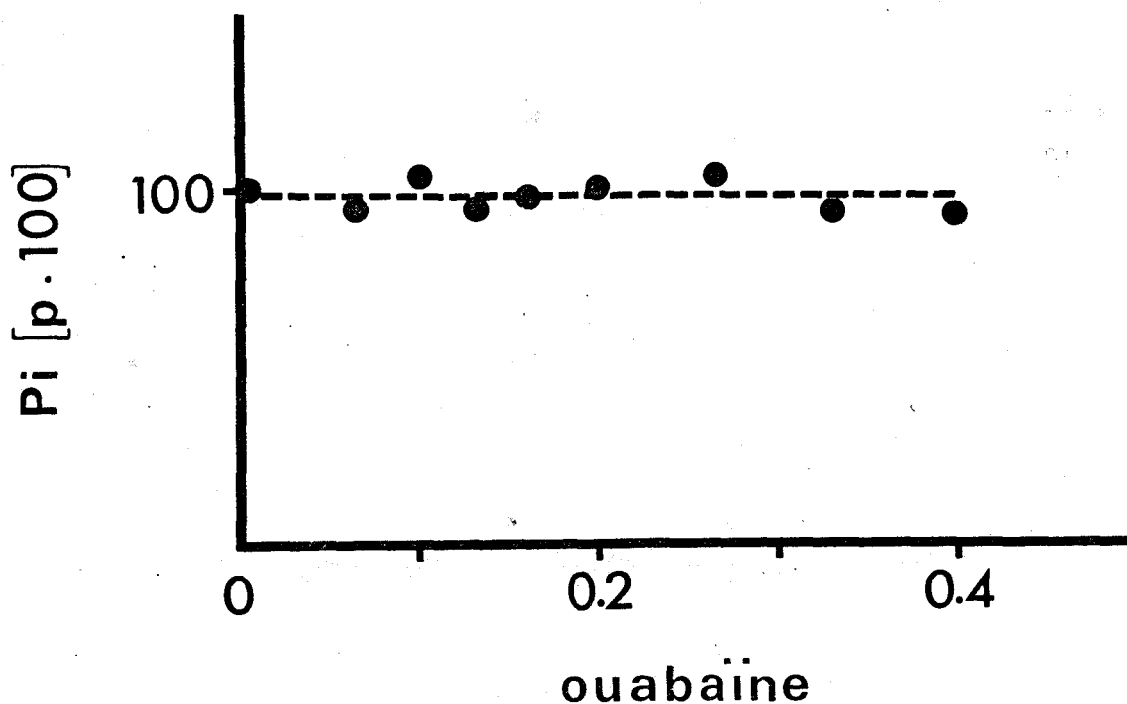
La concentration des ions, pour une concentration en ATP de 2 mM est :  $\text{Ca}^{++} = 1$  mM ;  $\text{Mg}^{++} = 7$  mM ;  $\text{Na}^+ = 54$  mM ;  $\text{K}^+ = 106$  mM ;  $\text{Cl}^- = 76$  mM ;  $\text{SO}_4^{--} = 22$  mM ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 52$  mM ; Tris HCl = 15 mM.

Comme pour les figures suivantes, les différents points de la courbe correspondent à la moyenne ( $m$ ) des valeurs, encadrée de son écart-type ( $\sigma$ ) pour un nombre de valeurs  $n = 6$ .

substrat ne soit évidente pour des concentrations comprises entre 3 et 4 mM, alors que l'activité ATPasique est beaucoup plus faible pour des concentrations comprises entre 2 et 1 mM. Compte tenu de ce résultat, pour la suite des expériences, la concentration en ATP sera fixée à 2 mM.

#### 4) Contrôle biochimique de la pureté

Un dernier contrôle au niveau de la préparation, avant de voir l'importance de l'environnement ionique, a consisté à vérifier l'absence d'ATPases membranaires dépendantes du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$ . En effet, l'activité de la  $(\text{Na}^+-\text{K}^+)$ -ATPase est inhibée par l'ouabaïne (DUNHAM et GLYNN, 1961 ; CHARNOCK et coll., 1975 ; INAGAKI et coll., 1974 ; GODFRAIND et DE POVER, 1975 ; SCHUURMANS STEKHOVEN et coll., 1976). La figure 12 montre en effet que cette substance n'a pas d'influence sur l'activité ATPasique des myofibrilles purifiées de crabe, montrant ainsi l'absence, au niveau de la préparation, d'ATPases membranaires dépendantes du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$ . Il faut toutefois préciser que cette substance n'altère pas l'activité ATPasique dépendante du  $\text{Ca}^{++}$  pourtant mise en évidence au niveau des membranes cellulaires (DUNHAM et GLYNN, 1961 ; CHA et coll., 1971) dans la mesure où SZASZ (1975) observe la même activité ATPasique en présence de 0,25 mM d'ouabaïne.





### 5) Effets de la force ionique et de l'activité des ions

Ainsi, désormais les réactions permettant de déterminer l'activité ATPasique de la préparation, où l'absence de membrane a pu être contrôlée, se font en présence de 105  $\gamma$  de protéines en suspension dans 1 ml, pendant une période de 10 minutes et avec une concentration d'ATP de 2 mM. Toutefois, ces paramètres étant déterminés, pour étudier l'importance de l'environnement ionique, les modifications des concentrations en ions vont entraîner des variations de la force ionique, au niveau des myofibrilles. En effet, de même qu'il était important de maintenir le pH, il importe de connaître la force ionique du milieu utilisé, celle-ci influençant l'activité ATPasique (voir LEGER et coll., 1975 ; WEBER et MURRAY, 1973 ; WHITE et TAYLOR, 1976). De fait, PERRY et GREY (1956) montrent qu'en augmentant la force ionique du milieu d'incubation des myofibrilles isolées, par addition de KCl, l'activité ATPasique myofibrillaire activée par le  $Mg^{++}$  est diminuée. De même, AZUMA et coll. (1975) indiquent que l'activité  $Ca^{++}$ -ATPasique de myosine de mollusque est réduite par l'augmentation du KCl. Cette diminution, également observée avec le NaCl, tend à montrer qu'elle n'est pas due à l'espèce ionique mais à la variation de force ionique. Toutefois, PORTZEHL et coll. (1969) montrent que le  $Ca^{++}$  requis par les myofibrilles de crabe pour l'activation ATPasique n'est que peu influencé par la force ionique alors que la concentration de  $Ca^{++}$  nécessaire au seuil d'activation ainsi qu'à l'activation totale des fibrilles de muscle de lapin est augmentée quand la force ionique du milieu est accrue. Le maximum d'activité ATPasique observé est toutefois plus faible lorsque la force ionique est augmentée.

#### Figure 12

*Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de la concentration d'ouabaine, en mM, du milieu de réaction.*

*La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes.*

*La concentration des ions est :  $Ca^{++} = 1\text{mM}$  ;  $Mg^{++} = 7\text{mM}$  ;  $Na^+ = 54\text{mM}$  ;  $K^+ = 106\text{mM}$  ;  $Cl^- = 76\text{mM}$  ;  $SO_4^{--} = 22\text{mM}$  ;  $CH_3CH_2COO^- = 52\text{mM}$  ; ATP = 2 mM ; Tris HCl = 15 mM.*

En fait, si la force ionique du milieu intervient en tant que tel, il peut également se faire que ce soit par l'intermédiaire d'une modification de l'activité des ions en solution dans la mesure où celle-ci est justement dépendante de la force ionique du milieu. En effet, il est possible, à partir de la relation de DEBYE-HÜCKEL de calculer l'activité de l'ion considéré en solution. En effet, si la force ionique du milieu  $I$  est égale à  $1/2 \sum m_i z_i^2$  soit environ  $1/2 \sum c_i z_i^2$  où  $m_i$  est la concentration en moles pour 1000 g de solvant,  $c_i$  la concentration en moles par litre et  $z_i$  la valence de l'ion considéré ; l'activité de l'ion dans la solution est donnée par la relation  $a_i = f_i c_i$  où  $f_i$  est un coefficient dépendant de la force ionique ( $I$ ) et  $c_i$  la concentration. Le coefficient  $f_i$  est déterminé à partir de la relation :

$$-\log f_i = \frac{A z_i^2 \sqrt{I}}{1 + B d_i \sqrt{I}} \quad \text{où}$$

$A$  est un coefficient qui dépend du solvant et de la température de la solution; ainsi, pour l'eau et à 18° C,  $A = 0,5005$ .

$B$  est un coefficient égal à 0,33.

$d_i$  est le diamètre de l'ion exprimé en Å (pour le  $\text{Ca}^{++}$ ,  $d_i = 6 \text{ Å}$ ).

$z_i$  la valence de l'ion considéré.

La figure 13 représente la courbe théorique relatant l'activité de l'ion  $\text{Ca}^{++}$  en fonction de la modification de la force ionique du milieu et pour des concentrations variées en  $\text{Ca}^{++}$  de 1, 2 et 4 mM. Il est ainsi possible de constater que pour une concentration de 1 mM de  $\text{Ca}^{++}$ , une variation importante de la force ionique de 0,1 à 0,3 ne modifie pas la valeur de l'activité de l'ion  $\text{Ca}^{++}$  en solution et de ce fait, ne pourrait expliquer une grande variation de l'activité ATPasique pour cette concentration de  $\text{Ca}^{++}$ . Pour l'ensemble des milieux utilisés, il sera fait état de l'activité des ions en solution afin de voir si une éventuelle variation de l'activité ATPasique est liée à une variation de l'activité des

ions. D'ores et déjà, il peut être mentionné que la force ionique n'intervient que très faiblement sur l'activité de l'ion dans la mesure où la force ionique varie de 0,1 à 0,25.

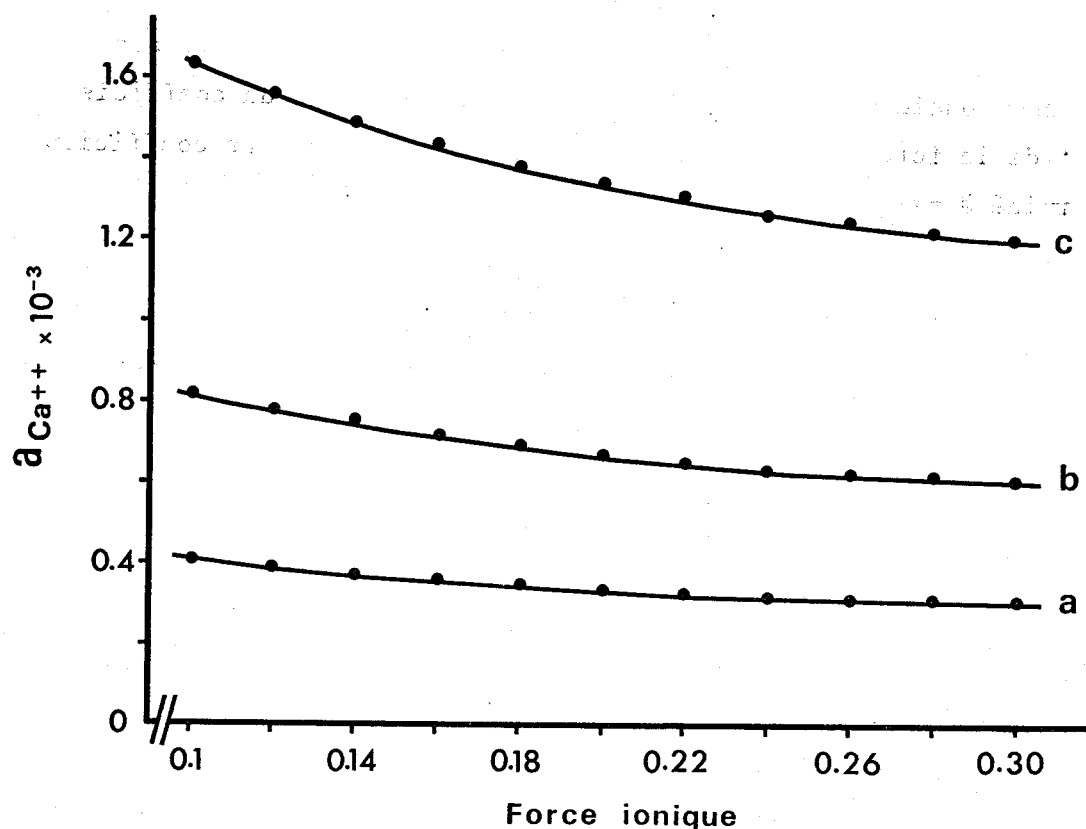


Figure 13

Activité du  $\text{Ca}^{++}$ . ( $a_{\text{Ca}^{++}}$ ) en solution, calculée d'après la relation de Debye-Hückel, en fonction de la force ionique du milieu.

Les courbes a, b et c sont tracées respectivement pour des concentrations initiales de  $\text{Ca}^{++}$  de 1, 2 et 4 mM.

$$a_{\text{Ca}^{++}} = f_i [\text{Ca}^{++}] \quad \text{avec} \quad -\log f_i = A z_i^2 \sqrt{I} / 1 + B d_i \sqrt{I}$$

Pour les différents symboles voir texte page 36.



## IV - EFFETS PROPRES DES IONS SUR L'ACTIVITÉ ATPASIQUE

### 1) Effets des ions divalents

Le rôle du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  dans l'hydrolyse de l'ATP a notamment été rapporté en détail par FUCHS (1974) pour le muscle strié. De même, la myosine du muscle lisse présente une activité ATPasique activée par le  $\text{Ca}^{++}$  ou le  $\text{K}^+$  et inhibée par le  $\text{Mg}^{++}$  (GRÖSCHEL-STEWART, 1971 ; YAMAGUCHI et coll., 1970 ; voir MURPHY, 1976).

Pour PERRY et GREY (1956), l'ATPase myofibrillaire activée par le  $\text{Mg}^{++}$  et le  $\text{Ca}^{++}$  montre de grandes différences dans l'hydrolyse de l'ATP selon la présence de ces deux ions. Au niveau des myofibrilles de crabe, DE VILLAFRANCA (1967) montre que l'ATPase myofibrillaire présente une activation calcique ainsi qu'une activation par le  $\text{Mg}^{++}$  ; de même, au niveau du complexe actine-myosine (actomyosine naturelle) de la même préparation, DE VILLAFRANCA et CAMPBELL (1969) montrent à pH 7, la présence d'une activation par le  $\text{Mg}^{++}$  présentant 2 optima : l'un dans le rang de la  $\mu\text{M}$ , l'autre au niveau de la  $\text{mM}$ , étant apparents lorsque la concentration en  $\text{KCl}$  est inférieure à 60  $\text{mM}$  (au-delà, seule subsiste l'activation pour la faible concentration en  $\text{Mg}^{++}$ ). L'activation calcique de ce dernier système n'ayant lieu que pour le niveau de la  $\text{mM}$ . Par contre, DE VILLAFRANCA et FRIEDMAN (1975) montrent que si l'ATPase de la myosine du crabe est activée par le  $\text{Ca}^{++}$ , elle est inhibée par le  $\text{Mg}^{++}$  ; la présence de légères traces d'actine dans la préparation pouvant expliquer la légère activation observée en présence de 1  $\text{mM}$  de  $\text{Mg}^{++}$  libre. L'activation par le  $\text{Ca}^{++}$  devient apparente avec  $5.10^{-5}$   $\text{M}$  de  $\text{Ca}^{++}$  libre. Toutefois, pour ces auteurs, le taux de  $\text{Mg}^{++}$  libre module l'activation par le  $\text{Ca}^{++}$ , et il y a une compétition directe entre ces deux ions pour les sites de la myosine.

#### 1-1) Effets du $\text{Ca}^{++}$

L'activité ATPasique des protéines myofibrillaires est en relation avec la fixation de  $\text{Ca}^{++}$  au niveau de ces protéines et commence lorsque cette fixation a atteint un seuil de 1,2 à 1,3  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{++}/\text{g}$  (WEBER, HERZ et REISS, 1969). PORTZEHL et coll. (1969) montrent d'ailleurs que l'activité ATPasique des fibrilles de crabe diminue après une

augmentation initiale lorsque la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  est trop élevée.

Au niveau de notre préparation, la figure 14 montre que l'activité ATPasique myofibrillaire est en relation étroite avec la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  (les concentrations en  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  étant celles de référence soit respectivement 7, 54 et 106 mM). Cette activité ATPasique me-

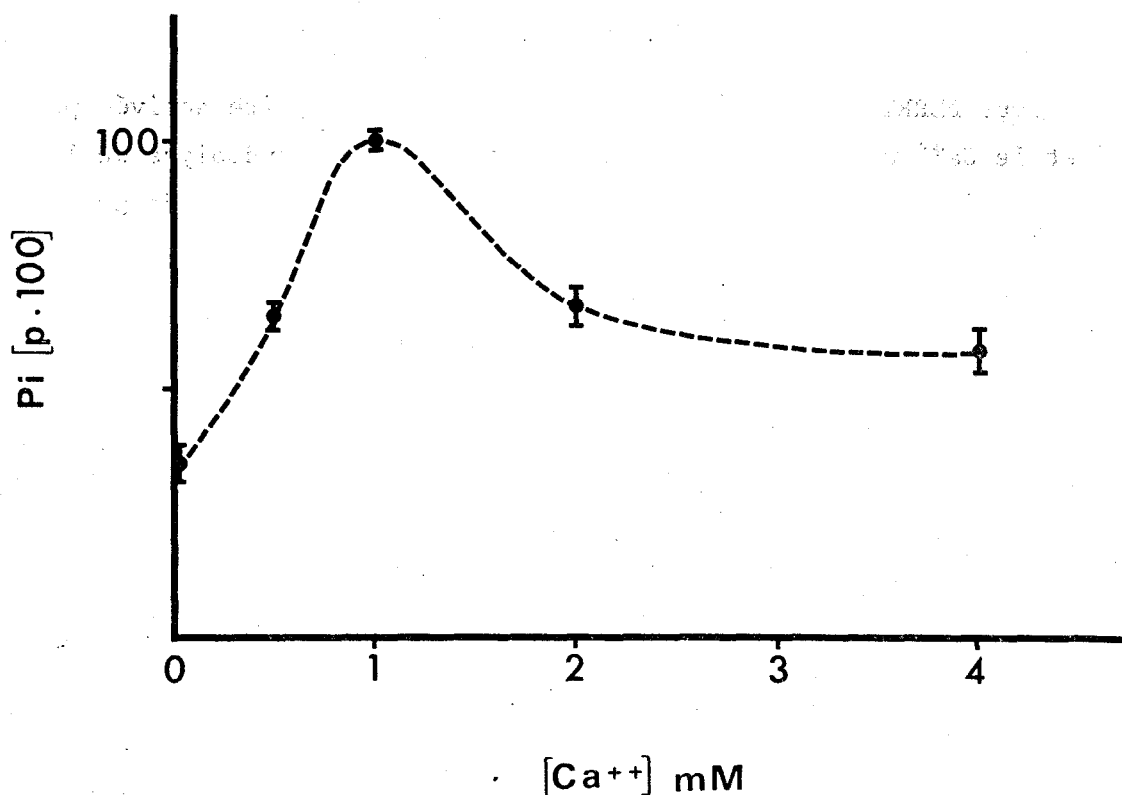


Figure 14

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{++}$ , en mM, du milieu de réaction.

La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes.

La concentration des ions de la solution de référence est :  $\text{Ca}^{++} = 1$  mM ;  $\text{Mg}^{++} = 7$  mM ;  $\text{Na}^+ = 54$  mM ;  $\text{K}^+ = 106$  mM ;  $\text{Cl}^- = 76$  mM ;  $\text{SO}_4^{--} = 22$  mM ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 52$  mM ; ATP = 2 mM ; Tris HCl = 15 mM. La variation de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

surée par la quantité de  $P_i$  libérée présente un optimum obtenu pour 1 mM de  $Ca^{++}$  en solution et se trouve être considérablement réduite pour des concentrations inférieures ou supérieures. Comme la force ionique ne varie que dans une gamme très restreinte soit de 0,206 à 0,216 en passant des concentrations de  $Ca^{++}$  de 1 à 4 mM, l'activité du  $Ca^{++}$  en solution est, de ce fait, directement proportionnelle à sa concentration initiale. La diminution de l'activité ATPasique ne peut donc résulter dans ce cas d'une modification de la force ionique. Ainsi, l'activité ATPasique des myofibrilles de crabe est dépendante de la concentration en  $Ca^{++}$  du milieu environnant et, la concentration optimale de 1 mM sera conservée pour la suite des dosages. Cette concentration optimale permet par ailleurs, comme cela sera vu ultérieurement, d'obtenir une contraction maximale des myofilaments isolés.

#### 1-2) Effets du $Mg^{++}$

Comme cela a été indiqué précédemment, non seulement le  $Ca^{++}$  intervient au niveau de l'activation myofibrillaire, mais également le  $Mg^{++}$ . Ainsi, DANCKER (1970) montre l'influence du  $Mg^{++}$  sur les ATPases des différents systèmes d'actomyosine naturel ou artificiel. De même, DE VILLAFRANCA (1967) signale une activation des ATPases myofibrillaires par le  $Mg^{++}$  à pH neutre. De fait, sur notre préparation, la figure 15 montre que l'activité ATPasique est dépendante de la teneur en  $Mg^{++}$  (celle en  $Ca^{++}$  étant de 1 mM). L'activité, cependant moins importante en absence de  $Mg^{++}$  ne varie que dans des proportions relativement faibles pour des variations importantes de  $Mg^{++}$  (de 0 à 7 mM) alors que la diminution est nettement marquée dès que la concentration en  $Mg^{++}$  s'élève à des valeurs supérieures à 7 mM. Là encore, comme pour le  $Ca^{++}$ , une corrélation très étroite sera établie ultérieurement avec la contraction des myofilaments des fibres de crabe. Il faut toutefois noter que pour de telles variations de la teneur en  $Mg^{++}$ , (l'apport étant réalisé sous forme de sulfate) la force ionique du milieu varie, en passant des concentrations de  $Mg^{++}$  de 1 à 15 mM, de 0,184 à 0,239. La concentration en  $Ca^{++}$  de ces solutions étant de 1 mM, il est alors possible de voir en se référant à la figure 13 que l'activité de l'ion  $Ca^{++}$  n'est que fort peu modifiée pour de telles variations de la force ionique. Dans de telles conditions, l'activité de



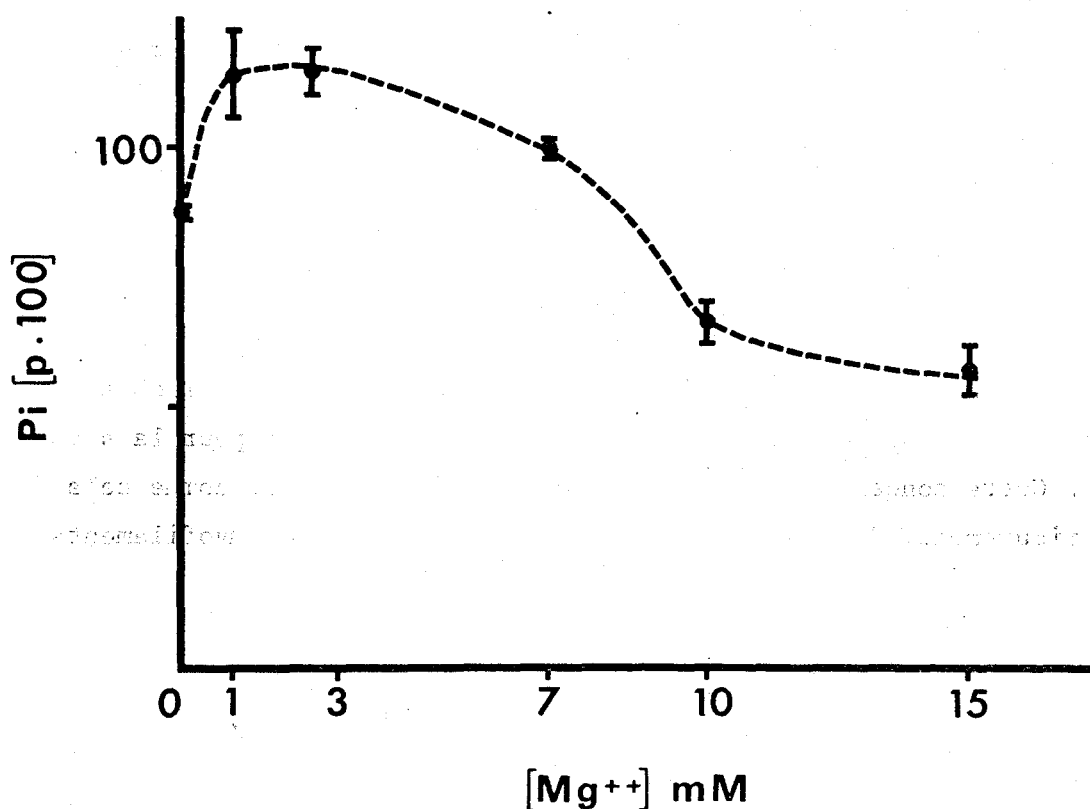


Figure 15

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de la concentration de Mg<sup>++</sup>, en mM, du milieu de réaction.

La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes.

La concentration des ions de la solution de référence est : Ca<sup>++</sup> = 1 mM ; Mg<sup>++</sup> = 7 mM ; Na<sup>+</sup> = 54 mM ; K<sup>+</sup> = 106 mM ; Cl<sup>-</sup> = 76 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 22 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 52 mM ; ATP = 2 mM ; Tris HCl = 15 mM. La variation de la concentration en Mg<sup>++</sup> est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en SO<sub>4</sub><sup>--</sup>.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

l'ion Mg<sup>++</sup> dépend directement de sa concentration dans la solution, le rapport entre la concentration et l'activité de l'ion restant quasiment constant. Ainsi, là encore, l'activité ATPasique des myofibrilles isolées de crabe est directement dépendante de la teneur du milieu environnant en Mg<sup>++</sup>. La courbe d'activation en fonction de la concentration de cet

ion présente, comme pour le  $\text{Ca}^{++}$ , un optimum cependant moins marqué. La valeur 100 p. 100 de  $\text{P}_i$  libéré a été prise pour 7 mM de  $\text{Mg}^{++}$ , cette concentration est celle retenue pour la suite des expériences. Le choix de 3 mM paraît être plus judicieux, mais cette valeur de 7 mM a été cependant prise compte-tenu des résultats acquis antérieurement au niveau de la contraction des myofilaments.

De même que l'activité ATPasique, dépendante du  $\text{Ca}^{++}$ , des membranes du reticulum sarcoplasmique est sensible aux effets activateurs et inhibiteurs des cations monovalents tels  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  ou  $\text{Li}^+$  (THE et HASSELBACH, 1972), celle des protéines myofibrillaires dépend également, comme nous allons le voir maintenant, de l'environnement en ions monovalents.

## 2) Effets des ions monovalents

Il a pu être montré que l'activité ATPasique, dépendante du  $\text{Ca}^{++}$ , de la myosine de muscle cardiaque et squelettique est inhibée par les cations monovalents tels que  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  (KATZ et coll., 1966 ; MUIR et coll., 1971 ; voir LEGER et coll., 1975). Ainsi, l'activité Ca-ATPasique de la myosine d'un mollusque (l'Haliotis ou Oreille de mer) est-elle diminuée par l'accroissement de la concentration en KCl, alors que celle de myosine de muscle lisse est usuellement activée par ce même KCl (AZUMA et coll., 1975). La diminution de l'activité Ca-ATPasique est également observée avec l'accroissement de la concentration en NaCl tendant toutefois à montrer que l'effet du sel n'est pas dû à l'espèce ionique mais à la modification de la force ionique (AZUMA et coll., 1975). De même, FENNER et coll. (1973) montrent que l'activité ATPasique de la myosine myocardique purifiée est activée par chaque ion  $\text{K}^+$  ou  $\text{Ca}^{++}$  alors que l'addition de l'un en présence de l'autre provoque une inhibition, tout comme le  $\text{Na}^+$  en présence de  $\text{K}^+$  ou de  $\text{Ca}^{++}$ . Pour ces auteurs, l'effet inhibiteur du KCl sur l'activité ATPasique de la myosine en présence de  $\text{CaCl}_2$  (10 mM) est similaire à celui noté par TRAYER et PERRY (1966) avec la myosine du muscle squelettique. De plus, les effets inhibiteurs de différents cations monovalents ont été étudiés en présence de  $\text{Ca}^{++}$  ou de  $\text{Mg}^{++}$  sur l'activité ATPasique de la myosine (KELEMEN et MÜHLRAD, 1969).

En ce qui concerne les protéines de structure de crabe, les concentrations optimales en  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  ayant été déterminées précédemment, la figure 16 montre l'effet des ions monovalents. Sur cette figure, la

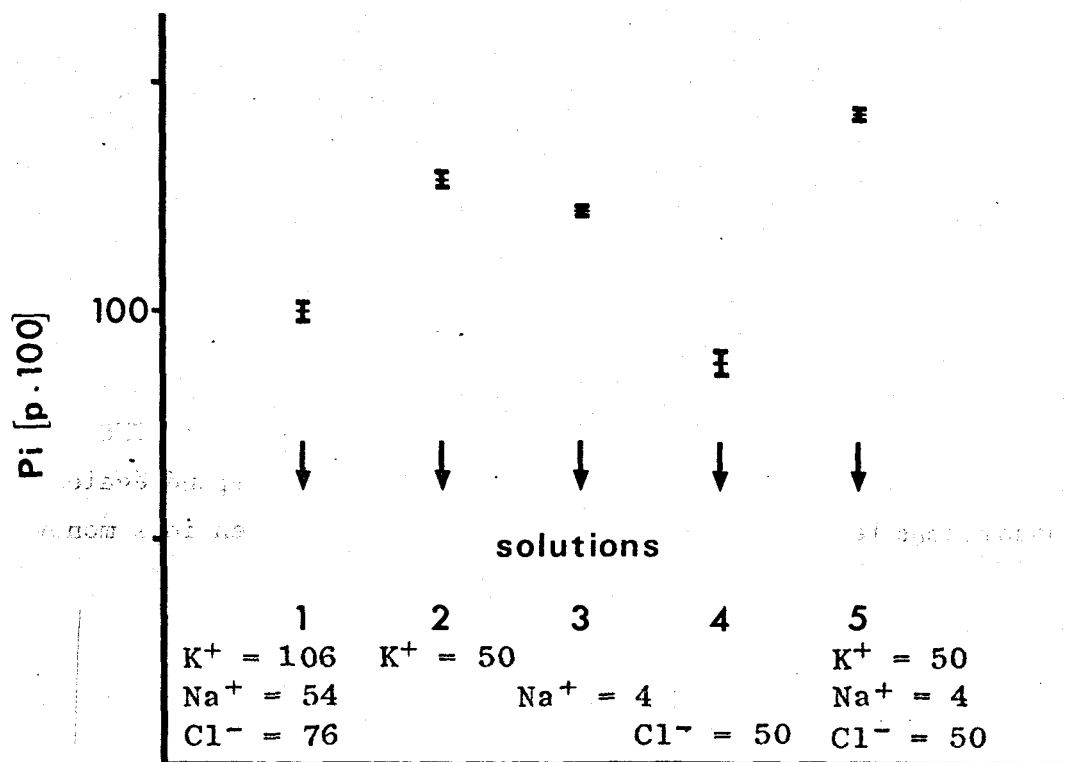


Figure 16

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de différentes concentrations en ions monovalents du milieu de réaction.

La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes,

La solution 1 correspond à celle de référence qui est :  $Ca^{++} = 1$  mM ;  $Mg^{++} = 7$  mM ;  $Na^+ = 54$  mM ;  $K^+ = 106$  mM ;  $Cl^- = 76$  mM ;  $SO_4^{--} = 22$  mM ;  $CH_3CH_2COO^- = 52$  mM ; ATP = 2 mM ; Tris HCl = 15 mM.

La solution 2 correspond à l'abaissement de la concentration en  $K^+$  (de 106 à 50 mM), en  $SO_4^{--}$  (de 22 à 7 mM) et en  $CH_3CH_2COO^-$  (de 52 à 26 mM).

La solution 3 correspond à l'abaissement de la concentration en  $Na^+$  (de 54 à 4 mM) et en  $CH_3CH_2COO^-$  (de 52 à 2 mM).

La solution 4 correspond à l'abaissement de la concentration en  $Cl^-$  (de 76 à 50 mM) et à l'accroissement de la concentration en  $SO_4^{--}$  (de 22 à 35 mM).

La solution 5 correspond à l'abaissement simultané des concentrations de  $K^+$  (106 à 50 mM), de  $Na^+$  (54 à 4 mM), de  $Cl^-$  (76 à 50 mM), de  $SO_4^{--}$  (22 à 7 mM) et de  $CH_3CH_2COO^-$  (52 à 2 mM).

Chaque point de la figure représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

solution 1 correspond aux conditions de référence c'est-à-dire avec une concentration en  $K^+$  égale à 106 mM, en  $Na^+$  de 54 mM et en  $Cl^-$  de 76 mM. Pour la solution 2, la concentration en  $Na^+$  est à sa valeur de référence (54 mM) alors que celle en  $K^+$  est abaissée à 50 mM ; la solution 3 présente au contraire une teneur en  $K^+$  standard alors que celle en  $Na^+$  est réduite à 4 mM. Pour la solution 4,  $K^+ = 106$  mM et  $Na^+ = 54$  mM, seule varie la concentration en  $Cl^-$  qui est amenée à 50 mM, alors que pour la 5, toutes les concentrations en  $K^+$ ,  $Na^+$  et  $Cl^-$  sont maintenues aux valeurs minimales précédemment données soit respectivement 50, 4 et 50 mM. Il n'a malheureusement pas été possible de voir l'influence propre de la diminution seule du  $Na^+$  et du  $K^+$  en maintenant le  $Cl^-$  à une valeur normale, car l'apport de  $Cl^-$  sous forme de chlorhydrate de choline entraîne, au moment du dosage, la formation d'un précipité de phosphomolybdate de choline. Sur cette figure 16 il est ainsi possible de constater qu'un abaissement de la concentration en  $K^+$  ou en  $Na^+$  (solutions 2 et 3) entraîne une augmentation relativement marquée de l'activité ATPasique des protéines de structure de crabe, alors qu'à l'inverse, l'abaissement de la teneur en  $Cl^-$  (solution 4) provoque une très légère diminution de cette activité. Par contre, un accroissement très net de cette activité ATPasique est obtenu lorsque l'ensemble de ces ions monovalents se retrouvent à de faibles concentrations (solution 5). Toutefois, il faut noter qu'en modifiant la concentration en ions monovalents du milieu environnant, la force ionique de ce milieu de réaction a été considérablement modifiée. Il faut de plus préciser qu'il est difficile de maintenir la force ionique constante dans la mesure où cela provoque une modification de la concentration anionique et cationique.

Si la force ionique est de 0,207 dans les conditions de référence, elle passe respectivement pour les solutions 2, 3, 4 et 5 à des valeurs de 0,137 ; 0,157 ; 0,221 et 0,087. De ce fait, il est possible de constater que les activités ATPasiques sont renforcées par l'abaissement de la force ionique, ce qui pourrait résulter, au vu de la figure 13, d'un accroissement de l'activité de l'ion  $Ca^{++}$  toutefois faible à la concentration de 1 mM pour la gamme des variations obtenues de la force ionique, ainsi que d'un accroissement de l'activité du  $Mg^{++}$ . Dans ces conditions cependant, l'accroissement de l'activité des cations divalents  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$  devrait,



en tout état de cause, compte tenu des résultats des figures 14 et 15, diminuer l'activité ATPasique en dépit du fait que selon les auteurs une augmentation de force ionique entraîne une diminution de l'activité ATPasique alors qu'à l'inverse une diminution entraîne un accroissement (voir § III-e). Cependant, il semble que les ions monovalents aient des effets propres, en dépit des modifications de force ionique des solutions ; cela sera d'ailleurs confirmé ultérieurement lors de l'étude de l'activité mécanique de ces myofilaments (chapitre III).

Par ailleurs, la faible variation d'activité ATPasique obtenue lors de l'abaissement de la concentration en  $\text{Cl}^-$  (solution 4, figure 16) est également mesurée lors d'un accroissement. Ainsi, la figure 17 montre que des modifications de la teneur en  $\text{Cl}^-$  dans une gamme de concentration de 50 à 106 mM ne provoquent que de faibles variations du taux d'hydrolyse de l'ATP ; dans ce cas, il faut mentionner que la variation de la teneur en  $\text{Cl}^-$  entraîne simultanément une variation de la concentration en sulfate, ceci afin de maintenir les concentrations de cations à leur valeur de référence. Cependant, en dépit de l'apport de sulfate, ions divalents, la force ionique du milieu ne varie que très peu (de 0,221 à 0,193 pour les valeurs extrêmes), et de ce fait, les activités des ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  dans les différentes solutions sont maintenues quasiment à la même valeur.

A l'inverse, quand tout le  $\text{Cl}^-$  de la solution est remplacé par différents anions perméants, qui habituellement traversent la membrane cellulaire ( $\text{NO}_3^-$ ) ou non tels que sulfate, méthylsulfate, il s'ensuit de larges modifications réversibles de l'activité ATPasique (figure 18). La suspension de myofibrilles, qui est obtenue au départ dans un milieu de  $\text{KCl}$  0,1 M, est lavée plusieurs fois par des solutions de nitrate, méthylsulfate ou sulfate de  $\text{K}^+$ . Il est ainsi possible d'obtenir des myofibrilles en suspension dans des solutions ne renfermant que très peu de chlore (à la concentration de l'ordre de la mM). Ces myofibrilles sont ensuite placées en réaction avec des solutions d'ATP, elles aussi, exemptes de  $\text{Cl}^-$ . Pour l'étude de la réversibilité, après le passage en milieu anionique varié, les myofibrilles sont relavées plusieurs fois de suite dans la solution standard soit  $\text{KCl}$  0,1 M, permettant ainsi le retour à un environnement ionique en  $\text{Cl}^-$  normal. Si l'activité ATPasique en milieu  $\text{Cl}^-$  est

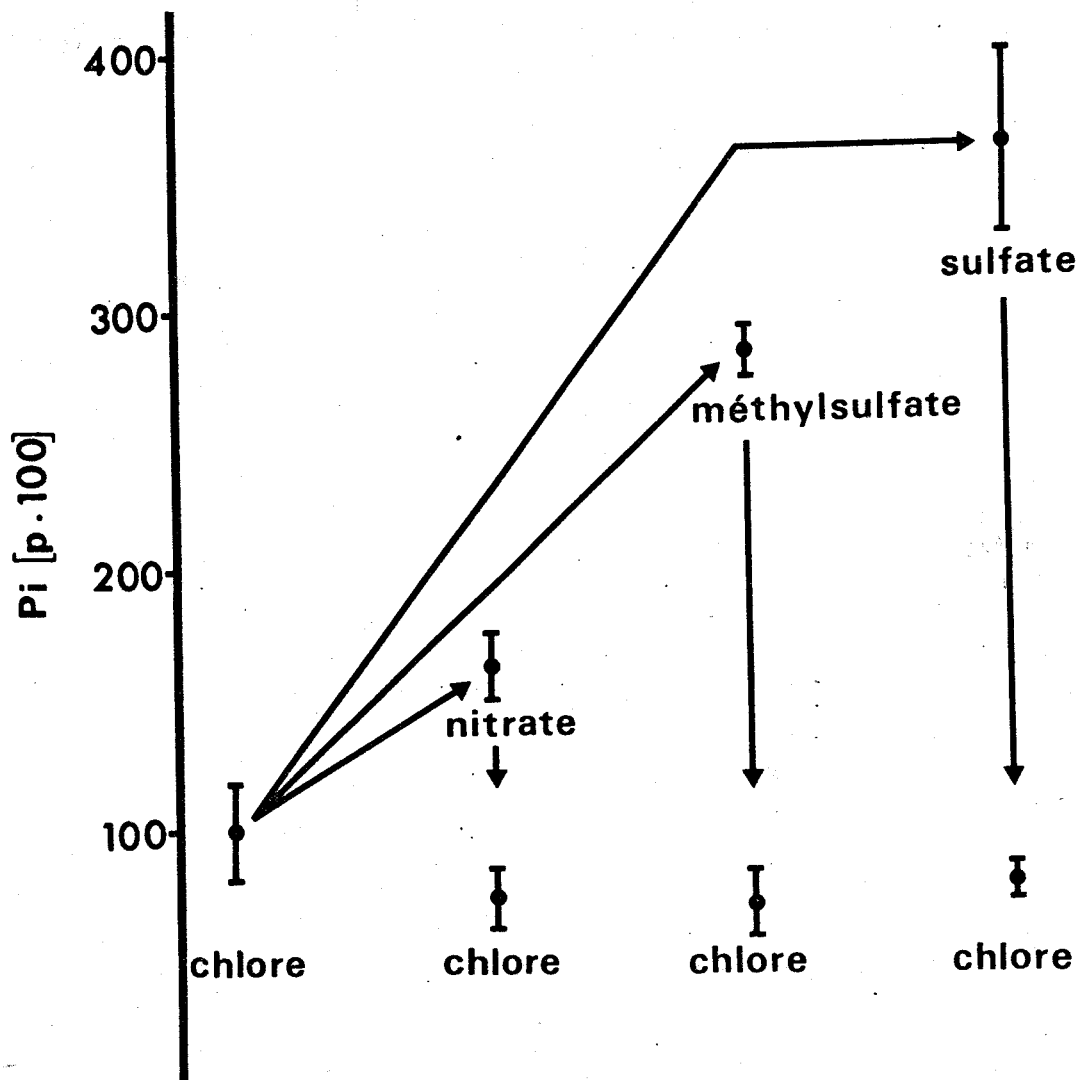
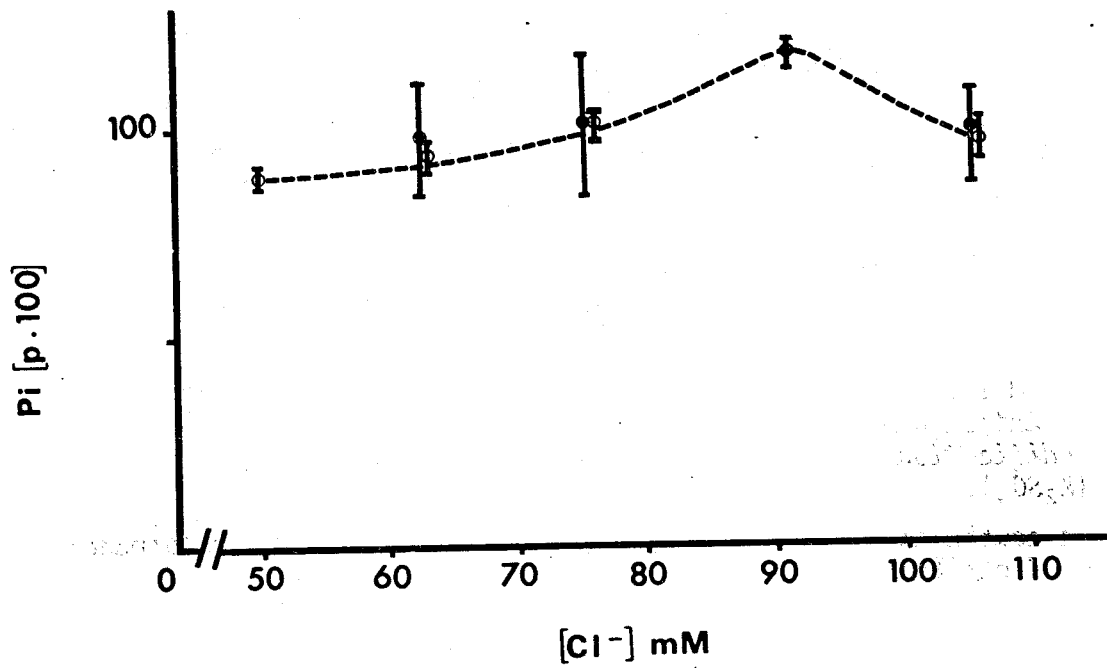


Figure 17

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de la concentration de  $\text{Cl}^-$ , en mM, du milieu de réaction.

La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes.

La concentration de la solution de référence est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 54 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 106 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 76 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 22 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 52 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 2 \text{ mM}$  ;  $\text{Tris HCl} = 15 \text{ mM}$ . La variation de la concentration en  $\text{Cl}^-$  ( $\text{KCl}$ ) est obtenue avec une modification simultanée et inverse de la concentration en  $\text{SO}_4^{--}$  ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ).

La courbe est obtenue à partir de 2 lots différents de suspension myofibrillaire (o et •).

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

Figure 18

Quantité de Pi libéré, exprimée en unités arbitraires (p.100), en fonction de l'environnement anionique du milieu de réaction.

La réaction qui se déroule dans un volume de 1 ml en présence de 105  $\gamma$  de protéines myofibrillaires dure 10 minutes.

La concentration de la solution de référence, correspondant au premier point noté chlore, est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 54 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 106 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 76 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 22 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 52 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 2 \text{ mM}$  ;  $\text{Tris HCl} = 15 \text{ mM}$ . Les points marqués nitrate, méthylsulfate et sulfate correspondent à l'activité ATPasique mesurée en présence de ces anions utilisés en remplacement des ions chlore.

Les dosages sont effectués à partir d'une même suspension myofibrillaire divisée en 4 parties (3 d'entre elles étant lavées en milieu sans chlore, soit en milieu nitrate, soit en milieu méthylsulfate, soit en milieu sulfate).

Les flèches dirigées vers le bas, après le passage en nitrate, méthylsulfate ou sulfate, indiquent que ces 3 suspensions sont relavées en milieu de référence et montrent que l'activité initiale obtenue en chlore est quasiment retrouvée, indiquant ainsi qu'au cours des différentes manipulations, les protéines de structure n'ont pas subi de dénaturation.

Chaque point de la figure représente  $n \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

prise comme référence et égale à 100 p. 100, la figure 18 montre qu'elle est considérablement augmentée lorsque tout le  $\text{Cl}^-$  est absent, l'importance de l'activation ATPasique par les anions de remplacement allant dans l'ordre croissant : nitrate, méthylsulfate, sulfate. En effet, l'activité ATPasique est environ 3,5 fois plus forte en milieu  $\text{SO}_4^-$  qu'en milieu de référence. Toutefois, là encore, obligatoirement, du fait du maintien de la concentration des cations à leur valeur de référence, le remplacement du  $\text{Cl}^-$  a entraîné une modification de la force ionique du milieu. En effet, si dans les conditions de référence, une partie du  $\text{K}^+$  est amenée sous forme de  $\text{KCl}$  et l'autre sous forme de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , dans ces nouvelles conditions l'ensemble du  $\text{K}^+$  est soit sous forme de nitrate, de méthylsulfate ou de sulfate. Ainsi, la force ionique, étant de 0,207 dans le milieu de référence, se trouve légèrement diminuée en nitrate et méthylsulfate soit 0,193 et augmentée avec l'anion divalent sulfate soit 0,246. Ces variations de force ionique n'entraînent, au vu de la figure 13, qu'une faible modification de l'activité du  $\text{Ca}^{++}$ , et il semble difficile cette fois d'attribuer, comme précédemment pour les cations monovalents, la forte augmentation d'activité ATPasique à une éventuelle modification de l'activité du  $\text{Ca}^{++}$ , d'autant plus que dans le cas du sulfate, l'accroissement de la force ionique entraîne une diminution de l'activité du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  et provoque de même une diminution de l'activité ATPasique.

Dans ces conditions, il semble plutôt qu'il faille attribuer les modifications d'activité ATPasique non pas à la concentration du  $\text{Cl}^-$  mais plutôt à la nature de l'anion en contact avec les protéines de structure. La figure 18 montre enfin, qu'après avoir été replacées dans les conditions standard, les myofibrilles présentent de nouveau un taux d'hydrolyse standard, traduisant donc des effets parfaitement réversibles.



## V - CONCLUSION

L'activité ATPasique des myofibrilles isolées de crabe présente un optimum pour une concentration en  $\text{Ca}^{++}$  de 1 mM, en  $\text{Mg}^{++}$  de 3 à 7 mM. Cette importance de la teneur en ions divalents sera soulignée au chapitre concernant l'étude de la contraction des myofilaments isolés, montrant une corrélation très étroite entre l'activité ATPasique et la contraction. Toutefois, si les effets des ions monovalents n'ont pas été étudiés de façon systématique sur l'activité ATPasique des protéines de structure, il faut souligner qu'ils jouent cependant un rôle non négligeable. En effet, l'absence de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{K}^+$  provoque l'accroissement de l'activité ATPasique sans pouvoir établir de façon précise ce qui revient aux variations de concentration de ces ions ou à la variation corrélative de la force ionique. Toutefois, il est possible de signaler, dès à présent, que la contraction des myofilaments n'est pas modifiée de façon importante par la variation de force ionique. Enfin, il est important de noter que la nature de l'environnement anionique des protéines de structure exerce un effet très important sur leur activité ATPasique. Peut être, est-il possible de considérer le  $\text{Cl}^-$  comme un anion régulateur de l'activité ATPasique, sa présence dans le milieu environnant les myofilaments freinant toute modification par trop importante de l'activité ATPasique ; les ions nitrate étant perméants et pouvant remplacer, comme cela est la règle, le  $\text{Cl}^-$ , entraînent peu de modification de l'activité ATPasique par rapport aux anions imperméants que sont le sulfate et le méthylsulfate. D'autre part, du fait que des variations importantes de concentration en  $\text{Cl}^-$  (de 50 à 106 mM) ne modifient quasiment pas l'activité ATPasique, une régulation de cette activité ATPasique pourrait, peut-être, être liée à la simple présence d'ions  $\text{Cl}^-$  dans le milieu environnant.



CHAPITRE III

ACTIVITE MECANIQUE DES MYOFIBRILLES DE CRABE

## I - POSITION DU PROBLÈME

## II - TECHNIQUES

## III - RÉSULTATS

1 - Effets de la concentration en ATP sur la contraction des myofilaments

2 - Effets de la concentration en ions sur la contraction des myofilaments

2.1. Effets propres des ions divalents

2.2. Effets propres des cations monovalents et des anions

2.2.1 Effets des cations monovalents à  $[Cl^-]$  normale

2.2.2 Effets des ions  $K^+$  à  $[Cl^-] \times 2$

2.2.3 Effets des anions

## IV - CORRELATION ENTRE L'ACTIVITÉ ATPASIQUE ET L'ACTIVITÉ MECANIQUE DES MYOFILAMENTS - CONCLUSION

## I - POSITION DU PROBLEME

La contraction des muscles striés est causée par un glissement des gros filaments de myosine entre les filaments fins d'actine. Ce phénomène de glissement dépend de l'interaction cyclique des "cross-bridges" des filaments de myosine avec l'actine et l'ATP (HUXLEY, 1969 ; HUXLEY, 1974) ; le clivage de l'ATP et le développement de tension résultent de l'interaction des filaments fins et des projections des gros filaments (voir aussi TONOMURA et INOUE, 1974).

Il est de même bien connu que le  $\text{Ca}^{++}$  régule, au niveau de la fibre musculaire, la contraction. Le muscle est en effet relaxé en absence de  $\text{Ca}^{++}$  et contracté si le  $\text{Ca}^{++}$  est présent à des concentrations micromolaires. Le  $\text{Ca}^{++}$  intervient en modulant l'interaction de la myosine avec l'ATP et l'actine (voir SANDOW, 1965 ; EBASHI et ENDO, 1968 ; WEBER et MURRAY, 1973 ; FUCHS, 1974 ; LEHMAN et coll., 1974 ; SZENT-GYÖRGYI, 1975). Il n'est toutefois pas possible de définir l'activation musculaire uniquement par l'intermédiaire du  $\text{Ca}^{++}$ , d'autres facteurs intervenant, notamment le  $\text{Mg}^{++}$  libre ionisé et le  $\text{Mg}^{++}$  lié sous forme de Mg-ATP. Ce Mg-ATP est de fait nécessaire à la relaxation et apparaît ainsi faire partie du système relaxant des myofibrilles au même titre que tropomyosine et troponine. Quant au  $\text{Mg}^{++}$  ionisé, il s'oppose à la fixation du  $\text{Ca}^{++}$  sur les sites myofibrillaires (WEBER et coll., 1963, 1969) et, la présence de  $\text{Mg}^{++}$  au niveau de préparation myofibrillaire permet de détacher des myofilaments le  $\text{Ca}^{++}$  activateur (GILLIS, 1972). Il faut préciser d'autre part que, sur des fibres glycélinées de vertébrés, l'addition de  $\text{Ca}^{++}$  n'est pas nécessaire pour développer la tension isométrique maximale ; seul le  $\text{Mg}^{++}$  est nécessaire (EDMAN, 1957 ; SEXTON et GERSTEN, 1967 ; voir STANLEY et DE VILLAFRANCA, 1971 a), suggérant ainsi que le processus de glycélinisation supprime, pour ces préparations, le  $\text{Mg}^{++}$  ; le  $\text{Ca}^{++}$  restant étant suffisant pour le développement de la tension. Par contre, pour les fibres de crabe, STANLEY et DE VILLAFRANCA (1971 a) montrent que la présence des deux ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  est nécessaire pour le développement de la tension maximale, alors que pour le psoas de lapin seul le  $\text{Mg}^{++}$  est requis. Ces auteurs montrent, de plus, que le processus de glycélinisation de tissu frais supprime plus de 90 p. 100 du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  et qu'ainsi, avec les faibles quantités

d'ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  restant, il est possible d'obtenir le développement d'une tension par addition seule d'ATP. Si le besoin en  $\text{Mg}^{++}$  et en ATP est généralement admis pour la contraction des muscles glycélinés, il n'en est pas de même du  $\text{Ca}^{++}$ . En effet, des observations de contraction de fibres musculaires extraites au glycérol sont constatées en absence de  $\text{Ca}^{++}$  et ne sont pas, de ce fait, conformes à l'opinion généralement admise, à savoir, que des quantités de  $\text{Ca}^{++}$  (de l'ordre de  $10^{-6}$  M) sont nécessaires pour la contraction des muscles et des fibres extraites au glycérol (CALDWELL et WALSTER, 1963 ; PORTZEHL et coll., 1964 ; WEBER et coll., 1964 ; voir NANNINGA et KEMPEN, 1971). Ces derniers auteurs rapportent par ailleurs, que deux types de contractions peuvent être obtenus avec les fibres musculaires glycélinées de lapin, à savoir une première rapide qui est Mg-ATP dépendante mais  $\text{Ca}^{++}$  indépendante et une seconde, plus lente qui est  $\text{Ca}^{++}$  et Mg-ATP dépendante.

Le raccourcissement myofibrillaire est également en relation avec l'activité ATPasique, et, le couplage mécano-chimique indique que la performance d'un muscle dépend non seulement du taux de déplacement des sites d'actomyosine mais aussi de l'efficacité avec laquelle chaque site transforme l'énergie de l'ATP en travail mécanique (TAKAUJI et HONIG, 1972). La force mécano-chimique peut également être produite par l'intermédiaire de "tête de myosine isolée" (HMM) avec de l'actine en présence d'ATP (OPLATKA et coll., 1974, 1975 ; BOREJDO et OPLATKA, 1976). Il faut de plus préciser qu'au cours de la contraction un changement conformationnel de la molécule de myosine peut être noté (BARANY et BARANY, 1970). De même, YANAGIDA (1976) met en évidence, par addition de  $\text{Ca}^{++}$  en absence d'ATP, au niveau de fibres glycélinées de crabe, un changement de biréfringence dans la région de chevauchement des filaments qui peut résulter d'un changement conformationnel des filaments fins en interaction avec le "cross-bridge" ou d'une modification de la position du "cross-bridge". En fait, dans le muscle glycéliné comme dans le muscle intact, la force développée est en rapport avec les sites de contact des filaments d'actine et de myosine et, le maximum de tension développée par ces fibres glycélinées qui peuvent servir de modèles de système contractile, est à rapprocher de celui du muscle intact (BUKATINA, 1971 a et b).

Par ailleurs, STANLEY et DE VILLAFRANCA (1971 b) précisent que



la contraction isométrique produite par des fibres glycélinées de crabe et de lapin peut être partiellement annulée par l'EDTA ou l'EGTA. L'action de ces chélateurs résulte en un effet comparable à la relaxation ; ils sont capables de séquestrer le  $\text{Ca}^{++}$  produisant ainsi la relaxation de la tension isométrique tout comme s'il y avait une inhibition de l'activité ATPasique de l'actomyosine. STANLEY et DE VILLAFRANCA (1971 b), après avoir précisé la nécessité de la présence de  $\text{Ca}^{++}$  et de  $\text{Mg}^{++}$  au niveau des fibres glycélinées de crabe, pour atteindre la tension maximale, montrent que lorsque ces fibres sont préalablement stockées dans un milieu avec EDTA ou EGTA, le besoin en ces cations  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  est plus important. Toutefois, si le besoin en cations divalents pour la contraction musculaire est évident, il ne faut pas oublier l'ATP qui intervient non seulement au niveau de la contraction, mais aussi au niveau de la relaxation ainsi que lors du maintien à l'état de repos. Ainsi, un épuisement en ATP, qui peut être dû au traitement d'une fibre, après rupture de la membrane par processus de glycélinisation par exemple, dans une solution sans ATP, provoque la formation de lien entre les molécules d'actine et de myosine, plaçant ainsi la préparation en état de rigor ; cet état de rigor étant originellement conçu comme une forme de contraction lente et ce complexe de rigor se trouve être un complexe entre actine et myosine sans nucléotide lié (SANDOW et SCHNEYER, 1955 ; MAURIELLO et SANDOW, 1959 ; TAKAHASHI et coll., 1970 ; BREMEL et WEBER, 1972 ; MARUYAMA et WEBER, 1972 ; MULVANY, 1975). En fait, le nombre de sites liant l'ATP dans les myofibrilles est le même durant la relaxation et la contraction, et est égal au nombre de "têtes" de myosine dans ces myofibrilles (MARUYAMA et WEBER, 1972).

Afin d'expliquer le mécanisme de la contraction, de nombreux modèles ont été proposés. Ainsi, pour TAWADA et coll. (1974), l'énergie délivrée par l'hydrolyse de l'ATP est thermodynamiquement utilisée pour le travail et la chaleur au moment de la contraction du muscle squelettique. Dans un premier temps, la myosine (E) est chargée avec l'énergie résultant de l'hydrolyse de l'ATP et, forme un complexe  $\tilde{E} = E \cdot \text{ADP} \cdot \text{Pi}$ , stockant l'énergie, qui constitue un site actif. En effet, dans ce modèle, l'interaction entre l'actine et la myosine implique deux sites actifs distincts, <sup>est</sup> un mécanisme élémentaire pour la contraction musculaire. Ces deux sites se trouvent localisés sur la myosine. L'un constitue le complexe myosine ADP.Pi et emmagasine l'énergie dérivée du clivage de l'ATP avant le début

de la contraction. L'autre forme le complexe myosine ATP et catalyse l'hydrolyse de l'ATP en utilisant une fraction de l'énergie stockée, l'hydrolyse au niveau de ce dernier site étant responsable de la tension développée.

D'autre part, la sensibilité au  $Ca^{++}$  de l'interaction actine-myosine est conférée par les protéines régulatrices troponine-tropomyosine et, partant de ces bases, un schéma de la régulation de la contraction est donné par POTTER et GERGELY (1974) (Fig. 19). En absence de  $Ca^{++}$ , correspondant à l'état relaxé, la TN-I. peut être liée au site de l'actine ainsi qu'à un site de la TM, prévenant ainsi toute interaction entre myosine et actine. Au moment de l'activation (voir par exemple, libération de  $Ca^{++}$  du R.S.) et de la combinaison du  $Ca^{++}$  avec la TN-C., les liens entre TN-I et actine-TM sont rompus, permettant ainsi l'interaction de la myosine et de l'actine. De même, pour DESHCHEREVSKY (1977) les fluctuations dans la position de la tropomyosine jouent un rôle dans le système régulateur de l'activité des protéines musculaires.

VOLKENSTEIN, en 1969, parle de la théorie moléculaire de la contraction basée sur les ponts actine-myosine ; cette formation de ponts étant suivie par une "transformation" des protéines contractiles. Le travail musculaire est déterminé par la déphosphorylation de l'ATP produite par l'activité de l'ATPase myofibrillaire (il y a une transformation de l'énergie des ponts macroénergétiques de l'ATP en travail mécanique). WARNER (1970) propose également: que le changement mécanique (repos  $\rightarrow$  contraction) a lieu à un niveau moléculaire et que le réarrangement moléculaire dépend de l'interaction entre les protéines et l'eau. Récemment, GERGELY (1977) reprend cet aspect moléculaire de la contraction et parle de changement conformationnel induit par le  $Ca^{++}$  et d'interaction des protéines entre elles.

Ainsi, l'hydrolyse de l'ATP initiée par le  $Ca^{++}$  permet la libération d'énergie et pour HATZE (1973), la théorie de la contraction est basée sur la présomption que l'énergie chimique est convertie en énergie électrique, laquelle est à son tour convertie en énergie mécanique et chaleur. L'énergie libérée par la molécule d'ATP est disponible dans une forme de charge négative avec en même temps une différence de potentiel entre l'actine et la partie haute de la sub-unité mobile HMM-S<sub>1</sub>. Un mécanisme électrostatique pour la transduction de l'énergie chimique, libérée

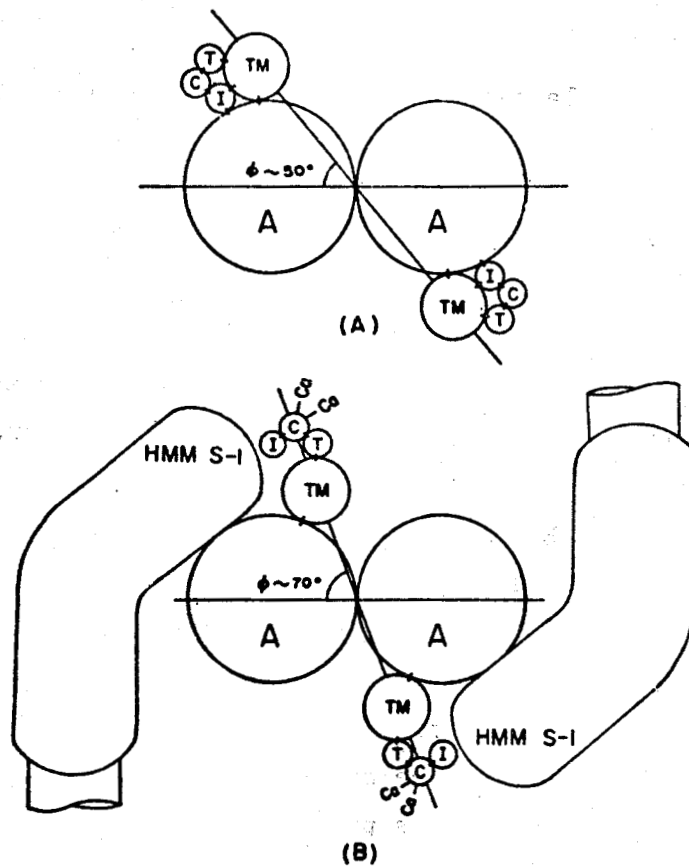


Figure 19

Schéma de la régulation de la contraction musculaire par TN et  $Ca^{++}$ .

Les positions relatives de l'actine, la tropomyosine et les têtes des molécules de myosine (HMM-S1) dans le modèle sont celles proposées par SPRIDICH et coll. (1972), HASELGRÖVE (1972), HUXLEY (1972), PARRY et SQUIRE (1973),

A = Actine ; TM = Tropomyosine ; T = TN-T ; I = TN-I ; C = TN-C.

(A) : relaxation en absence de  $Ca^{++}$  ; (B) : activation  $[Ca^{++}] = 1 \mu M$ .

Les interactions entre les protéines sont indiquées par un court trait de connection.

(d'après POTTER et GERGELY, 1974)



par hydrolyse de l'ATP, en énergie mécanique est également proposé par YU et coll. (1970). Ce mécanisme ne requiert pas la formation de liens entre les filaments, ni de mouvements des cross-bridges. Enfin, ORENTLICHER et GERSHO (1971) présentent un modèle pour le processus de la contraction qui incorpore les concepts biochimiques du cycle des ATPases de l'actomyosine et l'interaction de l'actine et de la myosine. Ainsi, différents modèles peuvent rendre compte de l'activation du mécanisme contractile.

Toutefois, ce phénomène contractile est, par ailleurs, montré dépendre de nombreux facteurs en dehors de ceux primordiaux que sont le  $\text{Ca}^{++}$ , le  $\text{Mg}^{++}$  et l'ATP. Et, comme l'activité ATPasique des myofibrilles de crabe vient d'être montrée dépendante de l'environnement ionique (cations mono et divalents ; anions : chlorure, sulfate, méthylsulfate et nitrate), il importe d'étudier l'influence de cet environnement, au niveau même des myofilaments intacts sur le phénomène contractile afin de voir si une corrélation parfaite entre la contraction et l'hydrolyse de l'ATP peut être obtenue.

## II - TECHNIQUES

Les fibres musculaires du méropodite des pattes locomotrices du crabe sont isolées comme cela a été indiqué au chapitre I. Elles sont ensuite placées dans une petite cuve en plexiglass d'une contenance de 1,5 ml (Fig. 20). La fibre est alors perfusée à 20° C dans cette cuve par un milieu de référence dont la composition est donnée par FATT et KATZ (1953). Le débit du liquide de perfusion est, pour les prétraitements de la fibre, de 5 ml par minute. Le changement de solution correspondant à la solution "contracturante" se fait quasiment instantanément par injection de ce milieu à l'aide d'une seringue et par aspiration de la solution de prétraitement par l'intermédiaire d'une trompe à vide.

La fibre est maintenue du côté de la carapace, par l'intermédiaire d'une mâchoire de plexiglass, tandis que l'autre extrémité (axostyle) est reliée par un crochet à la tige d'un transducteur, constitué par une cellule U I 5 P (tête de lecture d'électrophone, passant le continu) permettant une condition d'isométrie dans tous les cas au moins de 95 p. 100. Ce

transducteur, alimenté en 18 V donne pour une charge de 100 mg accrochée à l'extrémité du crochet une déviation de 400 mV. Il est en fait très fiable car les droites d'étalonnage établies régulièrement sont toujours superposables. La fibre est alors amenée à sa longueur d'équilibre ( $l_0$ ) qui est prise comme étant celle provoquant la plus faible tension décelable au niveau du transducteur (2 mg). Dès lors, elle est étirée de 25 p. 100 à partir de cette longueur d'équilibre.

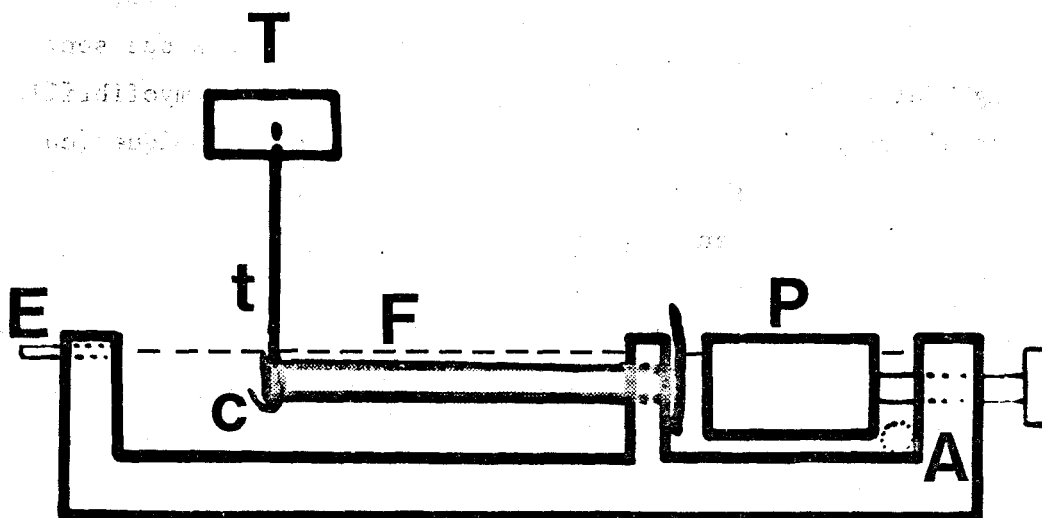


Figure 20

*Position de la fibre F dans la cuve expérimentale, lors de l'enregistrement du phénomène mécanique par l'intermédiaire d'un transducteur (T).*

*La fibre est maintenue du côté de la carapace par l'intermédiaire d'un bloc de plexiglass (P) et est reliée à l'autre extrémité à la tige (t) du transducteur par un crochet (c). L'arrivée des solutions se fait au niveau A et l'écoulement (E) est obtenu à l'aide d'une trompe à vide.*

L'obtention de myofilaments isolés à partir de cette fibre étirée dérive de la technique de JULIAN (1971) qui utilise, au niveau du semi-tendineux de grenouille, un court traitement au glycérol ainsi qu'à un détergent non ionique. Au niveau de notre préparation plusieurs étapes sont nécessaires à l'obtention de myofilaments.



Etape 1 - La fibre est soumise pendant 3 minutes à l'action du milieu de référence duquel est supprimé le  $\text{Ca}^{++}$  et le  $\text{Mg}^{++}$  et auquel est ajouté 5 mM d'EDTA de façon à éliminer le  $\text{Ca}^{++}$  de la fibre (la solution est tamponnée par le Tris à un pH de 6,8). L'EDTA semble, en effet, être l'agent le plus efficace pour supprimer les cations divalents, supprimant 15 p. 100 de plus de  $\text{Ca}^{++}$  que l'EGTA et une plus grande quantité de  $\text{Mg}^{++}$  que d'autres traitements ; cet agent chélateur a, au niveau de la contraction isométrique des fibres glycélinées de crabe, un effet comparable à la relaxation, et, est plus efficace pour produire cette dernière que l'EGTA (STANLEY et DE VILLAFRANCA, 1971 a, b ; DE VILLAFRANCA et FRIEDMAN, 1975). De plus, l'absence de cations divalents provoque une décohésion de la membrane (O'DONNELL et KOVACS, 1974).

Etape 2 - La fibre est baignée, pendant 1 minute, par un milieu équivalent au milieu intracellulaire ( $\text{K}^+ = 112$  mM,  $\text{Na}^+ = 54$  mM et  $\text{Cl}^- = 53$  mM). Cette solution est privée d'ions divalents et renferme de l'EDTA (5 mM).

Etape 3 - La fibre est placée en présence d'une solution hypertonique de glycérol renfermant 5 mM d'EDTA. L'augmentation importante de la pression osmotique entraîne une diminution du volume de la fibre, consécutive à une sortie d'eau (BLINKS, 1965) qui va avoir pour résultat le gonflement des tubules (BOLZER, 1961 ; KROLENKO et ADAMJAN, 1967 ; RAPOPORT et coll., 1968). La perte du couplage excitation-contraction intervient rapidement puisqu'après seulement 2 minutes d'action d'un milieu hypertonique (3160 mosm), la tension de la secousse de la fibre de crabe n'est plus que de 7 p. 100 de celle de référence (BRULE et coll., 1977 a). Pour la préparation de myofilaments isolés ("fibre brièvement glycélinée"), la fibre mise en présence d'une solution équivalente au milieu intérieur (étape 2) est placée dans un premier temps pendant 1 minute, dans une solution renfermant 50 p. 100 de glycérol, milieu équivalent à une pression osmotique créée par 6850 milliosmoles. Puis, elle est baignée, pendant 1 minute 30, par une solution de glycérol de 30 p. 100 (pression osmotique équivalente à celle créée par 4100 mosm).

Etape 4 - Dans le but de détruire les systèmes membranaires, la

fibres subit un choc osmotique par retour dans un milieu équivalent au milieu utilisé pour l'étape 1. Le retour à une pression osmotique normale provoque en effet une destruction sélective du système tubulaire transverse (EISENBERG et EISENBERG, 1968 a ; KROLENKO, 1969 ; NAKAJIMA et coll., 1969). D'une façon générale, les effets préalables de ce traitement au glycérol sur le couplage excitation-contraction ont été étudiés par de nombreux auteurs (FUJINO et coll., 1961 ; EISENBERG et GAGE, 1967 ; HOWELL et JENDEN, 1967 ; EISENBERG et EISENBERG, 1968 b ; GAGE et EISENBERG, 1969 ; HOWELL, 1969 ; KROLENKO, 1969, 1971 ; FUJINO et coll., 1972 ; NAKAJIMA et coll., 1973). Le retour aux conditions initiales, à savoir au milieu de référence (étape 1) est réalisée pour une durée de 2 minutes afin de bien laver la préparation.

Etape 5 - Finalement, cette fibre "glycérinée" est mise en contact d'une solution dite relaxante en ce sens qu'elle renferme non seulement du  $K^+$ , du  $Na^+$  et du  $Cl^-$  (respectivement, 112, 54 et 53 mM), de l'EDTA (5 mM) mais aussi  $Mg^{++}$  et de l'ATP (4 mM). En effet, des myofibrilles en suspension en présence de  $Ca^{++}$  maintenu à un niveau inférieur au seuil d'activation, restent relâchées seulement en présence de  $Mg^{++}$  et d'ATP, et l'addition seule d'ATP provoque une synérèse accompagnée d'une stimulation de l'activité ATPasique (GILLIS, 1972). Le relâchement des myofibrilles est obtenu lorsque la solution contient du  $Mg^{++}$  à des concentrations équimolaires à celles de l'ATP en présence de moins de  $10^{-8}$  M de  $Ca^{++}$  (GILLIS, 1972), ce qui correspond à notre milieu. La contraction de telles préparations est, dès lors, obtenue par élimination de l'EDTA et addition de  $Ca^{++}$ .

Ces différents traitements successifs sur la fibre isolée de crabe, permettent d'éliminer les systèmes membranaires et d'obtenir ainsi une préparation de myofilaments isolés. L'examen d'une telle préparation en microscopie électronique (dû à l'obligeance de P. DELORME) montre que les membranes sont rompues et que les contacts diadiques décrits précédemment (chapitre I), ne sont plus fonctionnels du fait de la désolidarisation des membranes tubulaires et réticulaires (Figs 21 et 22).



Figure 21

*Fibre musculaire striée squelettique de crabe, soumise à divers traitements, dont celui au glycérol 50 p.100, destinés à obtenir une préparation de myofilaments.*

*A : coupe transversale ; B : coupe longitudinale.*

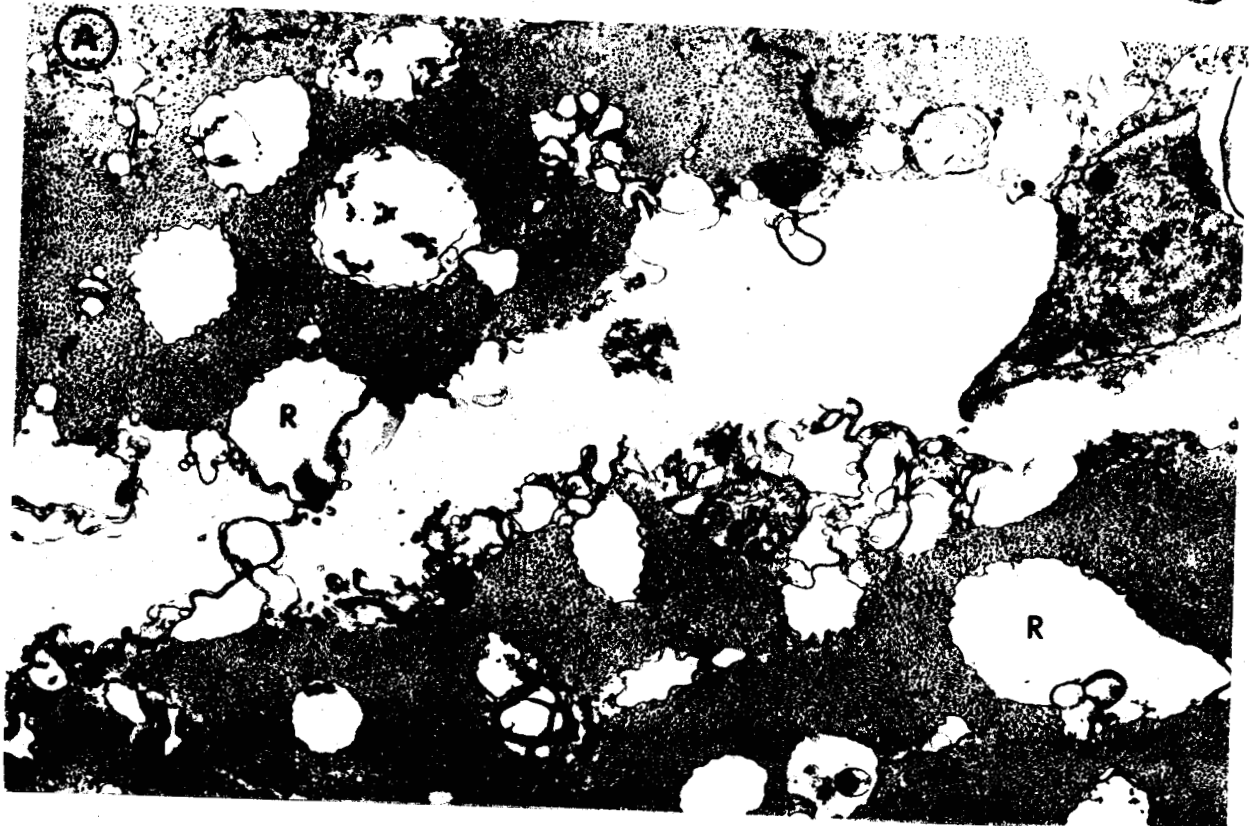
*L'examen au faible grossissement montre la rupture des membranes tubulaires et un gonflement très important du reticulum sarcoplasmique (R)*

*A : bande A ; B : basale ; I : bande I ; Z : ligne Z.*

*Grossissement : A = 15 000 ; B = 10 000.*

*(Dû à l'obligeance du Professeur P. DELORME)*

BUS  
LILLE



BUS  
LILLE



Figure 22

Fibre musculaire striée squelettique de crabe, soumise à divers traitements, dont celui au glycérol 50 p.100, destinés à obtenir une préparation de myofilaments.

L'examen à un grossissement plus fort (B) permet d'observer l'importance du gonflement du reticulum sarcoplasmique (R) et la rupture des membranes à différents niveaux rendant ainsi les diades (D) non fonctionnelles.

Grossissement : A = 12 000 ; B = 75 000.

(Dû à l'obligeance du Professeur P. DELORME)

Toutefois, au cours de la préparation de ces "myofilaments isolés", ces derniers se trouvent, après rupture des membranes par le glycérol, pendant un court instant, en présence d'un milieu dépourvu d'ATP pouvant provoquer un état de rigor. Cependant, l'addition d'ATP aux différentes solutions utilisées pour l'obtention de ces "fibres brièvement glycélinées" ne modifie en rien les résultats obtenus lors de leur contraction. L'ensemble des solutions utilisées est tamponné par le Tris (pH = 6,8).

La contraction développée par ces myofilaments est enregistrée par l'intermédiaire du transducteur UI 5P sur un enregistreur à plume Allcoscript type EN 28. La tension développée lors de cette contraction est exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ . La surface de la section de la fibre est déterminée avant son traitement c'est-à-dire dans le milieu de référence. La section des fibres étant très variable d'un endroit à l'autre d'une même fibre, des mesures de diamètres moyens sont effectuées tout au long de cette préparation. La section est, malgré la forme différente, standard sur la longueur d'une même fibre et, la difficulté à déterminer avec précision la section est palliée par le grand nombre de mesures, certaines parties de la fibre étant plus faciles à mesurer que d'autres. Ainsi, en ce qui concerne la fibre de crabe "brièvement glycélinée", étudiée dans nos conditions, la tension sera exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$  de façon à pouvoir corréler les résultats avec ceux obtenus lors de l'enregistrement des contractions.

Une telle préparation de "fibres glycélinées" peut servir pour l'étude de l'influence directe de l'environnement ionique sur l'activité mécanique des myofibrilles. Aussi, un essai de corrélation entre cette activité mécanique et l'activité ATPasique précédemment mesurée peut permettre d'entrevoir l'efficacité du couplage mécano-chimique.

### III - RESULTATS

#### 1) Effets de la concentration en ATP sur la contraction des myofilaments

Il est connu que la concentration du substrat intervient sur

l'ampleur du raccourcissement myofibrillaire par le biais de l'hydrolyse de l'ATP. En effet, si l'ATP est nécessaire au maintien de l'état relaxé, il participe également au processus de la contraction du muscle vivant, et, l'ampleur de la contraction est liée à la concentration en ATP (HOTTA et BOWEN, 1970). De même, au niveau des fibres musculaires glycélinées, STANLEY et DE VILLAFRANCA (1970) montrent l'effet de la concentration en ATP sur la production du maximum de tension isométrique. Ce maximum de tension développée est atteint, en ce qui concerne la fibre de crabe (horseshoe crab), lorsque la [ATP] est égale à 5 mM, en absence d'ions divalents  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ ; des taux supérieurs à 10 mM d'ATP provoquant une relaxation. L'ensemble du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  n'étant pas éliminé par le processus de glycélinisation, l'obtention d'une contracture est possible par la seule addition d'ATP. Ces auteurs signalent de plus que la latence entre l'introduction d'ATP et le début de la contracture ne montre pas de corrélation avec les dimensions de la fibre, bien que le problème de la diffusion se pose puisque l'ATP est placé à l'extérieur. BOWEN et MARTIN (1963) montrent cependant, au niveau du psoas de lapin, qu'une millimole d'ATP peut pénétrer entièrement dans une fibre traitée au glycérol lorsque celle-ci est contenue dans un faisceau qui ne dépasse pas 175  $\mu$  de diamètre. Un tel faisceau peut être utilisé avec la probabilité qu'une à 2 mM d'ATP affectent toutes les fibres et fibrilles. Toutefois, l'activation de fibres glycélinées, obtenue par l'ATP, consiste en un processus relativement lent (GILLIS et MARECHAL, 1974) et il est possible que l'activation de faisceau de fibres glycélinées, par solution d'ATP externe soit incomplète à cause du taux limite de diffusion de l'ATP, autour et dans la fibre (HASSELBACH, 1952 b ; GILLIS, 1972). De même, PERRY et GREY (1956) parlent du problème de la diffusion de l'ATP au niveau des myofibrilles.

En ce qui concerne notre préparation, la figure 23 montre que la tension s'établit lentement après l'introduction du milieu de contraction au contact de la fibre. Ce milieu contracturant renferme non seulement les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  aux concentrations que nous considérerons par la suite comme normales, mais aussi les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  aux concentrations respectives de 1 et 7 mM permettant ainsi une bonne activité ATPasique et, comme nous le verrons par la suite, une bonne activité mécanique. Le développement plus ou moins rapide de la tension de contraction pourrait s'expliquer par une faible vitesse de diffusion de l'ATP à l'intérieur de

la fibre, dépendante de la géométrie et des dimensions de la fibre. Toutefois, afin de standardiser, les fibres utilisées avaient des diamètres voisins. L'examen de cette figure 23 permet de voir que si la tension développée passe par un maximum et se maintient durant quelques temps (de l'ordre de la minute), il n'est pas possible de la maintenir plus longtemps car il y a, en effet, rupture de la préparation à des niveaux toujours différents selon les préparations. En fait, cette rupture est comprise dans la mesure où la fibre est "glycérinée" et où les sarcomères présentent des

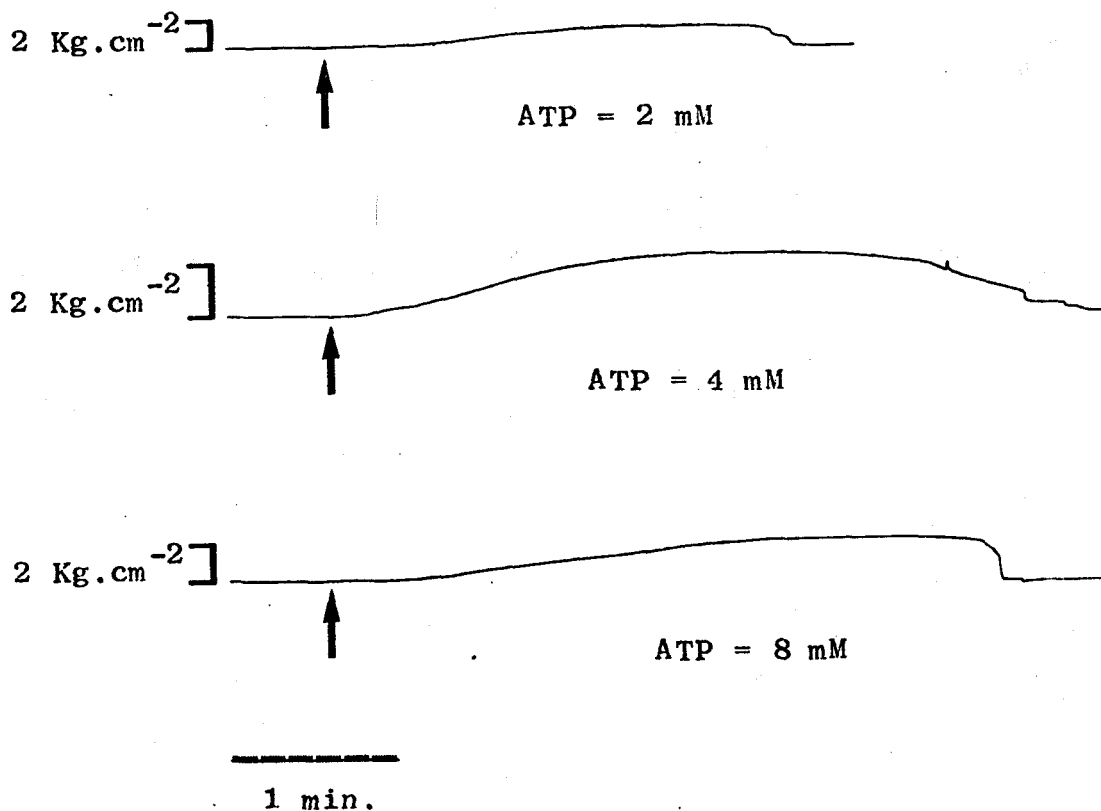


Figure 23

Exemples d'enregistrement de la contraction maximale des myofilaments consécutive à l'application de milieux de différentes concentrations en ATP.

La concentration du milieu de référence (ATP = 4 mM) est : Ca<sup>++</sup> = 1 mM ; Mg<sup>++</sup> = 7 mM ; Na<sup>+</sup> = 62 mM ; K<sup>+</sup> = 112 mM ; Cl<sup>-</sup> = 53 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 36,5 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 56 mM.

Les flèches indiquent le début de l'application de la solution de contraction.

longueurs différentes (FRANZINI-ARMSTRONG, 1966, 1970 ; DE VILLAFRANCA, 1961 ; MATHIEU, 1970 ; HWANG et CHEUNG, 1975, sur la fibre musculaire de crabe ; PAOLINI et coll., 1976, sur le semi tendineux de grenouille). Ainsi, au niveau de chaque sarcomère, du fait de leur différence de longueur, les forces génératrices élémentaires sont différentes et peuvent expliquer la rupture des myofilaments à des niveaux variés, d'autant qu'il n'y a plus aucune structure membranaire de soutien au niveau d'un tel "système glycérociné". Toutefois, au niveau du plateau, la tension enregistrée peut être considérée comme étant la tension maximale dans la mesure où, comme nous le verrons ensuite, elle est équivalente à la tension de contracture d'une fibre placée dans les conditions normales.

L'importance du rôle de l'ATP dans la contraction de ces systèmes est exprimée dans la figure 24 pour deux concentrations déterminées de  $Mg^{++}$ , 7 et 3 mM (la concentration en ions monovalents  $K^+$  et  $Cl^-$  est constante). Les résultats montrent que pour chaque courbe, l'optimum de tension dépend de la teneur en ATP, et que dans les deux cas, la concentration optimale requise est de 4 mM. Pour des valeurs supérieures, la tension développée par la fibre diminue d'autant plus que la concentration en  $Mg^{++}$  est faible. Cette concentration optimale requise pour le développement de la tension maximale est toutefois supérieure à celle nécessaire pour obtenir le maximum d'activité ATPasique qui est de 2 mM (chapitre II). Cependant, à la différence de l'activité ATPasique, lors de la contraction de fibres glycérocinées, les myofilaments sont en place et, compte-tenu de la diffusion de l'ATP à l'intérieur de ce système, il est possible qu'une plus grande quantité d'ATP soit nécessaire à l'extérieur de la préparation afin d'obtenir une concentration au contact de tous les myofilaments de l'ordre de 2 mM. La tension maximale, enregistrée dans ces conditions expérimentales, est de  $2,5 \text{ Kg.cm}^{-2}$  (lorsque la concentration en  $Mg^{++}$  est de 7 mM). Cette tension correspond, comme cela sera vu au chapitre suivant, à celle enregistrée au niveau de la fibre intacte lors d'une contracture potassique maximale. Toutefois, dès à présent, la figure 24 révèle aussi que la tension dépend non seulement de la teneur en ATP du milieu, mais également de l'environnement ionique, notamment dans ce cas particulier, en ions  $Mg^{++}$ . L'activation maximale du mécanisme contractile est observée, dans ce cas, pour une concentration en ATP de 4 mM et, de ce fait, cette dernière sera retenue pour la suite des expériences.



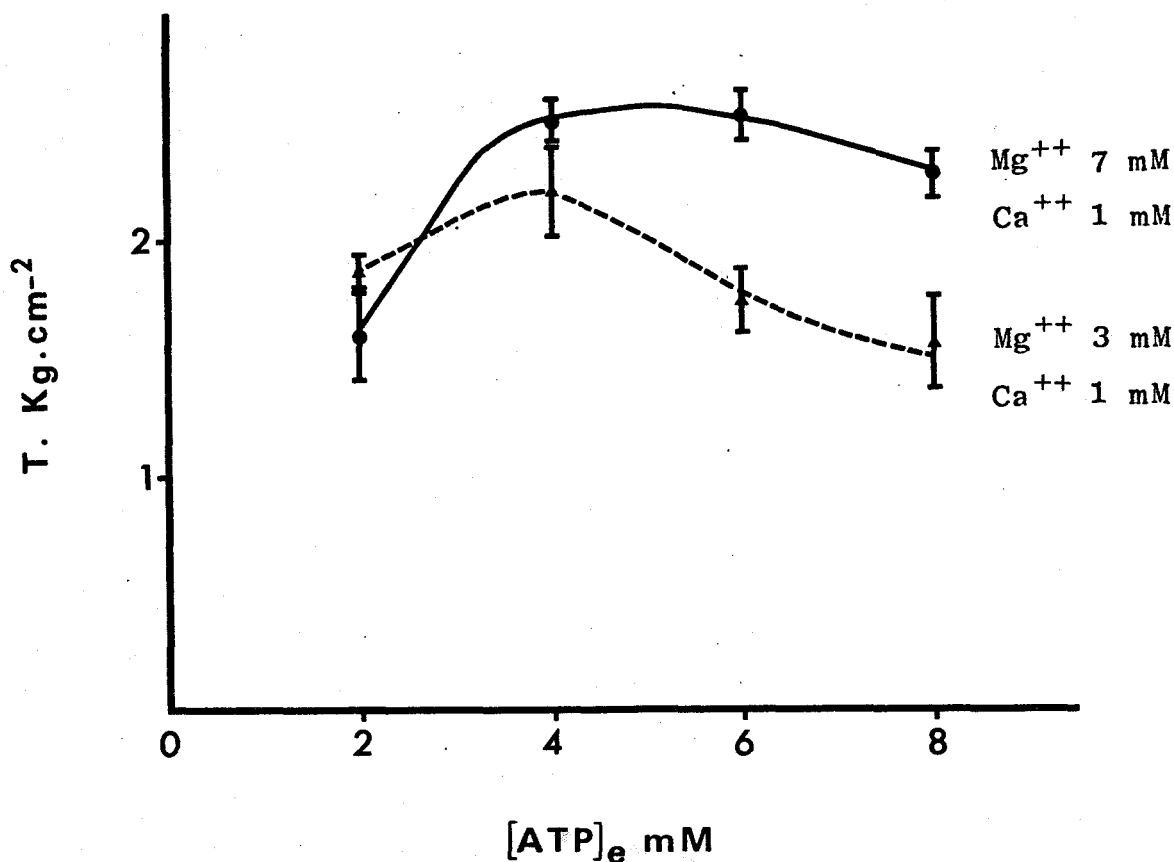


Figure 24

Tension mécanique maximale développée par les myofilaments, exprimée en Kg.cm<sup>-2</sup>, en fonction de la concentration d'ATP, en mM, du milieu de contraction pour deux concentrations de Mg<sup>++</sup> (7 et 3 mM).

Pour tous ces milieux, les concentrations en ions sont : K<sup>+</sup> = 112 mM ; Ca<sup>++</sup> = 1 mM ; Cl<sup>-</sup> = 53 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 56 mM ; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> = 32,5 mM pour Mg<sup>++</sup> = 3 mM et 36,5 mM pour Mg<sup>++</sup> = 7 mM ; Na<sup>+</sup> = 58 mM pour ATP = 2 mM, 62 mM pour ATP = 4 mM, 66 mM pour ATP = 6 mM et 70 mM pour ATP = 8 mM.

Chaque point des courbes représente  $m \pm \sigma$  (n = 6).

## 2) Effets de la concentration des ions sur la contraction des myofilaments

La régulation de la contraction de l'actomyosine par le Ca<sup>++</sup> est en fait un processus complexe qui nécessite la participation de protéines régulatrices et requiert la présence d'ATP et de Mg<sup>++</sup> (WEBER et WINICUR, 1961 ; WEBER et HERZ, 1962, 1963 ; ENDO, 1964). Le Ca<sup>++</sup> abolit l'action relaxante du système troponine-Mg ATP (WEBER, HERZ et REISS, 1969).

Au niveau des cellules cardiaques pelées, perfusées dans un milieu sans  $\text{Ca}^{++}$ , FABIATO et FABIATO (1975 b) observent qu'une diminution de la concentration de Mg ATP produit une tension. Le maximum de tension est alors observé pour une  $[\text{Mg ATP}]$  égale à  $10^{-5,5}$  M avec une pCa égale à 9,5 ; la tension augmente lorsque pMg ATP s'abaisse de 7 à 5,5 et diminue pour des valeurs inférieures à 5,5. D'autre part, KERRICK et DONALDSON (1972) montrent, sur une fibre pelée de ~~semi-~~tendineux de grenouille, que les effets du changement de  $[\text{Mg ATP}]$  et de  $[\text{ATP}]$  sont séparés et sont faibles comparés à ceux de  $[\text{Mg}^{++}]$ . De plus, à ce rôle important des ions divalents, s'ajoute celui des ions monovalents. En effet, des fibres musculaires, traitées au glycérol, lavées pendant un temps assez long (2 à 3 heures) en KCl isotonique, présentent une contraction en présence d'ATP, de KCl et de  $\text{MgCl}_2$  (BENDALL, 1953). L'addition de  $\text{CaCl}_2$  (0,2 mM) ne provoque pas de variations. Cependant, si le raccourcissement est lent en présence seule de KCl et d'ATP, il est rapide dès l'addition de  $\text{MgCl}_2$  (0,5 mM). Par contre, pour  $[\text{Mg}^{++}] \gg 2$  mM, si la préparation est lavée pendant un temps plus court (10 à 15 minutes), l'addition de  $\text{CaCl}_2$  (0,2 mM) augmente la vitesse du raccourcissement. La compétition entre le  $\text{Ca}^{++}$  et le  $\text{Mg}^{++}$  est montrée au niveau des fibres glycélinées et, FUCHS et BAYUK (1976) indiquent que la présence de  $\text{Mg}^{++}$  supprime en fait la liaison du  $\text{Ca}^{++}$  à environ la moitié du nombre total des "sites liants" des fibres glycélinées.

Au niveau des fibres musculaires de crabe, le développement de la tension semble dépendre entièrement de la présence d'ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  (STANLEY et DE VILLAFRANCA, 1971 a). De même, la tension développée par la fibre musculaire pelée d'écrevisse est fonction de la pCa et présente une relation en S avec un maximum obtenu pour une pCa égale à 6 lorsque la  $[\text{Mg ATP}]$  est égale à 1 mM (BRANDT et coll., 1972). Le rôle du  $\text{Ca}^{++}$  est en fait de supprimer l'interaction inhibitrice entre l'excès de Mg ATP et les protéines contractiles. Les effets du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  sont également montrés sur des fibres glycélinées par HOTTA et BOWEN (1970) qui indiquent que le  $\text{Mg}^{++}$  à des concentrations de  $10^{-5}$  à  $10^{-4}$  M accélère la contraction induite par l'ATP. En fait, la contraction survient lorsque le  $\text{Ca}^{++}$  libre dans le cytoplasme atteint une certaine concentration et se lie aux myofibrilles ; l'actine et la myosine forment alors des complexes générateurs de force (voir WEBER et MURRAY, 1973). L'importance primordiale des cations

divalents  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  est donc beaucoup étudiée au niveau de l'activation du mécanisme contractile ; toutefois, il ne faut pas oublier les cations monovalents ainsi que les anions qui, comme cela a été montré au chapitre précédent, interviennent de façon non négligeable sur l'activité ATPasique de cette préparation. Ainsi, comme dans le précédent chapitre, le rôle respectif de ces différents ions ainsi que celui de la force ionique, seront vus successivement.

### 2.1. Effets propres des ions divalents

La région sensible du muscle strié de crabe, permettant une activation locale est située au niveau de la jonction bande A - bande I (HUXLEY, 1956 ; HUXLEY et TAYLOR, 1958 ; GILLIS, 1967, 1969). Au niveau des myofibrilles isolées de crabe GILLIS (1967) en utilisant la libération par ionophorèse d'ions  $\text{Ca}^{++}$  à la pointe d'une micropipette remplie d'une solution de  $\text{CaCl}_2$ , montre que le seuil du courant ionophorétique, nécessaire pour produire une contraction, est minimal lorsque la pipette renfermant des ions  $\text{Ca}^{++}$  est localisée au niveau A.I ; le seuil de courant augmente avec l'éloignement de la pipette le long de la bande I par rapport à la jonction A.I. La bande I renferme, en effet, les sites responsables de l'activation calcique. De fait, au niveau de l'activation myofibrillaire, FUCHS et BRIGGS (1967, 1968) mettent en évidence 2 classes de sites liant le  $\text{Ca}^{++}$  présentant des constantes d'affinité différentes ( $2,1 \cdot 10^{-6}$  M pour la classe 1 et  $3 \cdot 10^{-4}$  M pour la classe 2). La capacité de liaison des sites de classe 1 ( $1,3 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{++}$ /g de protéines) correspond finalement à la quantité de  $\text{Ca}^{++}$  lié pour provoquer la contraction des myofibrilles ( $1,5$  à  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{++}$ /g de protéines). De plus, ces sites de classe 1 sont localisés au niveau des filaments fins. Toutefois, en plus du  $\text{Ca}^{++}$ , l'importance de l'environnement ionique en  $\text{Mg}^{++}$  au niveau des fibres pelées d'écrevisse a notamment été étudiée par BRANDT et coll. (1972) qui montrent l'évolution de la tension en fonction de la concentration en Mg ATP à différente valeur de pCa. De même, ces auteurs obtiennent une relation sigmoïde lorsqu'ils considèrent l'évolution de cette tension en fonction de la pCa (pour des valeurs de  $\text{Mg}^{++}$  de 1 et 5 mM). Une relation du même genre est obtenue avec des cellules cardiaques pelées par FABIATO et FABIATO (1975 b) ou sur des fibres glycélinées de grenouille par JULIAN (1971). L'interdépendance entre le  $\text{Ca}^{++}$  et le  $\text{Mg}^{++}$  est également donnée

par KERRICK et DONALDSON (1975) qui montrent, à la fois sur le muscle ventriculaire de rat et sur les fibres squelettiques de grenouille, privées de sarcolemme, que la quantité de  $\text{Ca}^{++}$  requise pour obtenir la tension maximale du muscle augmente avec la  $[\text{Mg}^{++}]_e$ .

En ce qui concerne notre préparation, la figure 25 donne des exemples d'enregistrements de contraction obtenue par application au contact des myofilaments d'une solution renfermant du  $\text{Mg}^{++}$  à la concentration de 7 mM et des concentrations variées de  $\text{Ca}^{++}$ . De même, la figure 26 donne des exemples d'enregistrement de tension mécanique pour des concentrations variées en  $\text{Mg}^{++}$  en présence de 1 mM de  $\text{Ca}^{++}$ . Là encore, dans ces 2 cas, la tension se maintient durant environ 1 minute puis la préparation "se casse". L'ensemble des résultats obtenus, en ce qui concerne l'activation par un milieu contenant du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$ , se trouve résumé par les courbes des figures 27 et 28. Les deux courbes de la figure 27 donnent l'évolution de la tension en fonction de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  du milieu pour deux valeurs différentes de  $\text{Mg}^{++}$  à savoir 1 et 3 mM (les concentrations en ions monovalents étant celles de référence et celle en ATP de 4 mM). Ainsi, la tension augmente progressivement avec l'accroissement de la teneur en  $\text{Ca}^{++}$  jusqu'à un optimum atteint dès la valeur d'1 mM puis se maintient pour des concentrations supérieures. Par contre, ainsi que le montre la figure 28, pour un environnement ionique en  $\text{Mg}^{++}$  plus grand (7, 10 et 15 mM), l'allure des courbes est modifiée. En effet, si pour chacune de ces concentrations la tension augmente encore avec un accroissement de la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  jusqu'aux environs de la mM, il n'en est plus de même au-delà puisque la tension développée n'est plus cette fois maintenue, mais chute progressivement. Cette diminution de la tension est, de plus, plus importante pour une concentration en  $\text{Mg}^{++}$  de 7 mM. Pour toutes les concentrations de  $\text{Mg}^{++}$  choisies, la concentration optimale de  $\text{Ca}^{++}$  qui permet, dans les conditions expérimentales, le développement d'une tension mécanique maximale est de l'ordre de la millimole. Cependant, si pour cette concentration calcique la tension développée par les myofilaments est maximale pour une concentration de  $\text{Mg}^{++}$  de 7 mM, il n'en est pas de même pour des concentrations en  $\text{Ca}^{++}$  supérieures. En effet, la concentration de  $\text{Mg}^{++}$  qui permet alors l'activation maximale est de 3 mM. Quoiqu'il en soit, de l'ensemble des résultats, il s'avère que la tension développée se rapprochant le plus de celle enregistrée lors de la contracture maximale développée par une

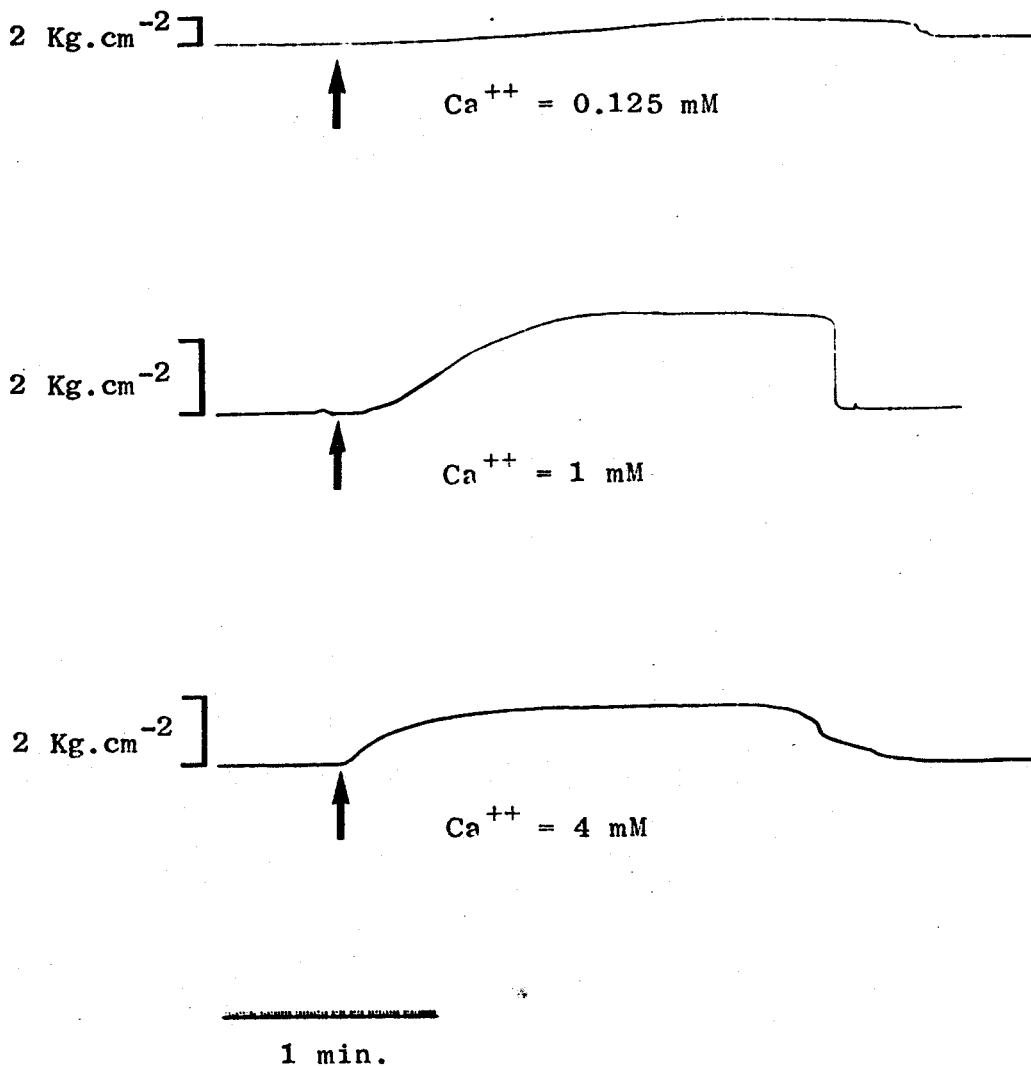


Figure 25

Exemples d'enregistrement de la contraction maximale des myofilaments consécutive à l'application de milieux de différentes concentrations en Ca<sup>++</sup>.

La concentration du milieu de référence est : Ca<sup>++</sup> = 1 mM ; Mg<sup>++</sup> = 7 mM ; Na<sup>+</sup> = 62 mM ; K<sup>+</sup> = 112 mM ; Cl<sup>-</sup> = 53 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 36,5 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 56 mM ; ATP = 4 mM. La variation de la concentration en Ca<sup>++</sup> est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>.

Les flèches indiquent le début de l'application de la solution de contraction.

La terminologie Ca<sup>++</sup> = 1 mM (qui sera reprise par la suite avec d'autres ions) est utilisée pour simplifier ; en fait, il s'agit de propionate de Ca<sup>++</sup> = 1 mM.



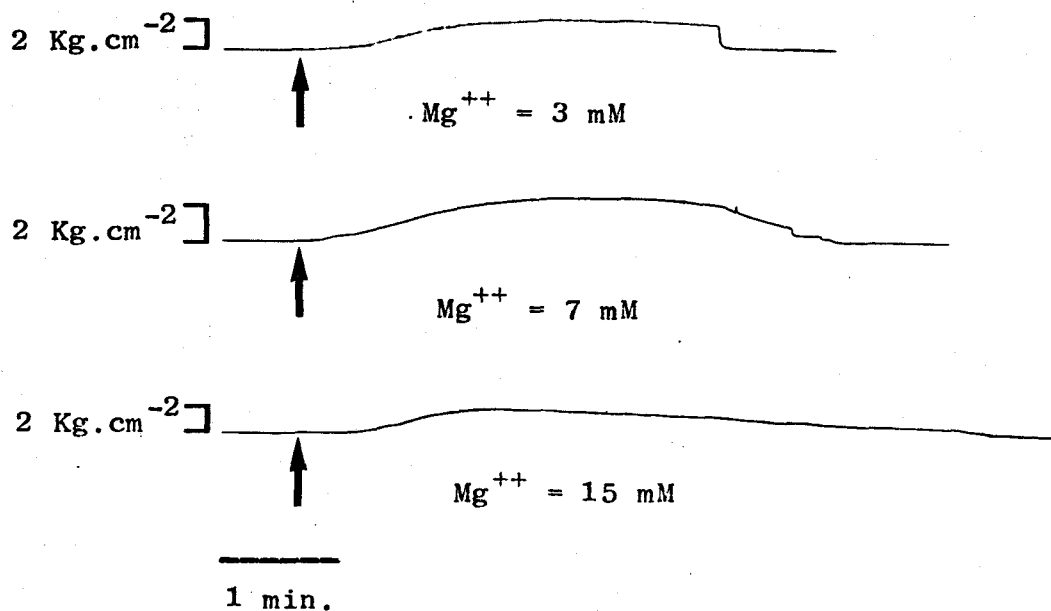


Figure 26

Exemples d'enregistrement de la contraction maximale des myofilaments consécutive à l'application de milieux de différentes concentrations en  $Mg^{++}$ .

La concentration du milieu de référence est :  $Ca^{++} = 1$  mM ;  $Mg^{++} = 7$  mM ;  $Na^+ = 62$  mM ;  $K^+ = 112$  mM ;  $Cl^- = 53$  mM ;  $SO_4^{--} = 36,5$  mM ;  $CH_3CH_2COO^- = 56$  mM ; ATP = 4 mM. La variation de la concentration en  $Mg^{++}$  est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en  $SO_4^{--}$ .

Les flèches indiquent le début de l'application de la solution de contraction.

fibre intacte lors d'un excès de  $K^+$ , est obtenue en présence de 1 mM de  $Ca^{++}$  et 7 mM de  $Mg^{++}$  ( $2,5$   $Kg.cm^{-2}$  contre  $2,7$   $Kg.cm^{-2}$ ). Ces résultats sont, de plus, en accord avec ceux obtenus lors de la mesure de l'activité ATPasique de ces myofilaments (chapitre précédent). En effet, ces concentrations permettent une hydrolyse maximale de l'ATP, et ainsi une bonne corrélation entre l'activité ATPasique et l'activité mécanique des myofibrilles de crabe est donc obtenue.

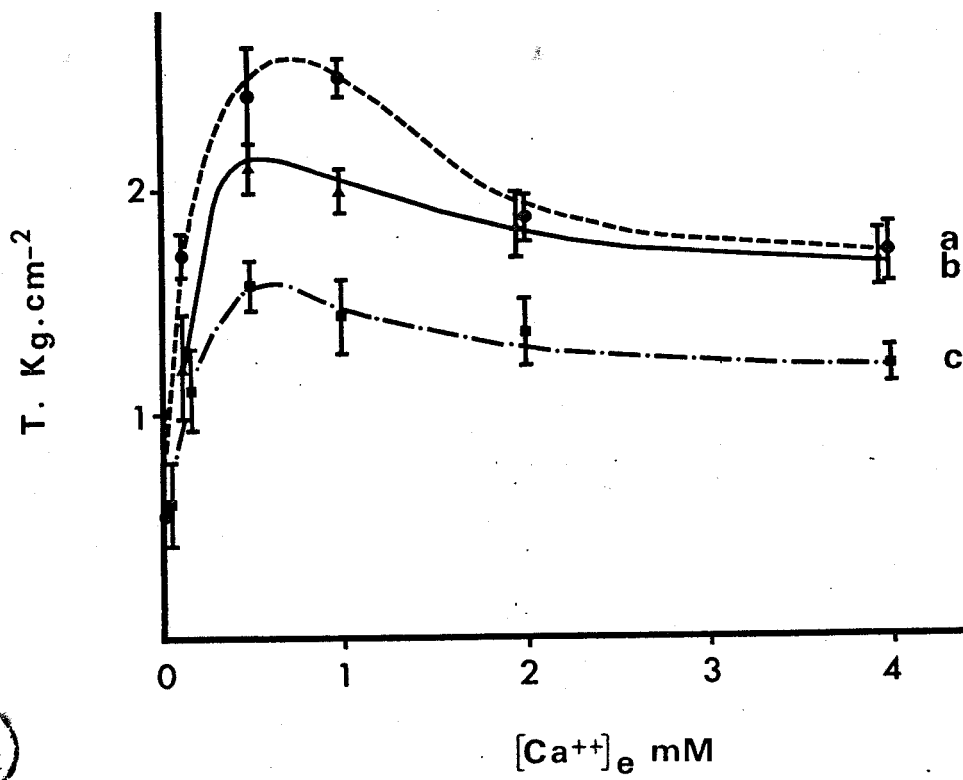
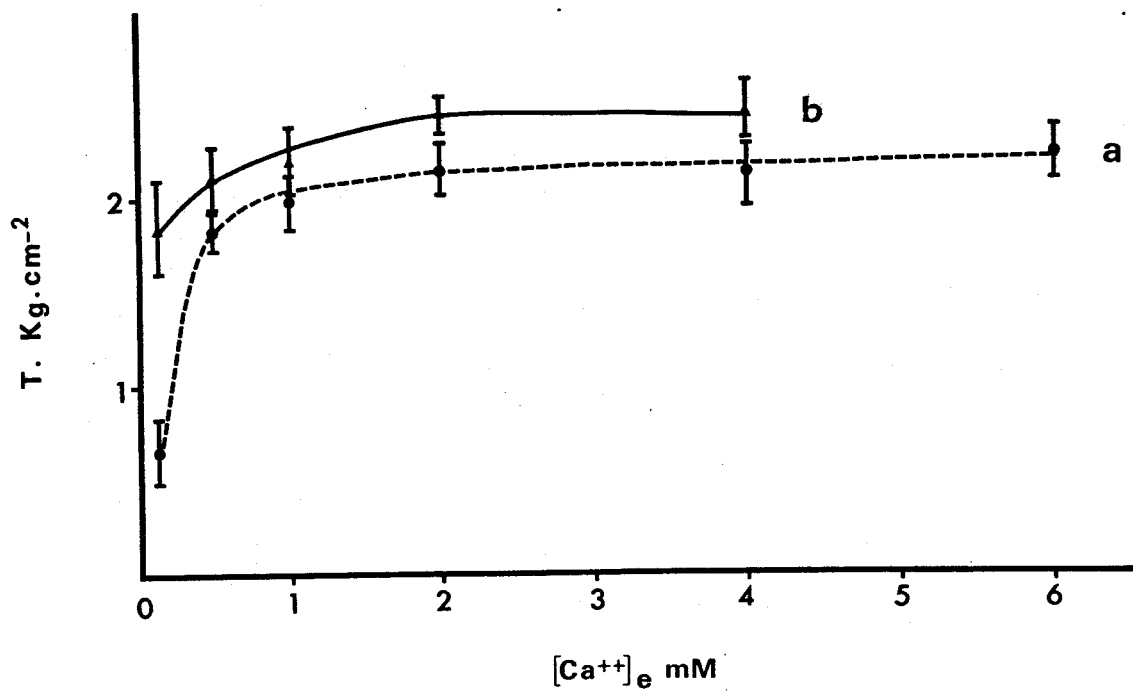


Figure 27

Tension mécanique maximale développée par les myofilaments, exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ , en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{++}$ , en mM, du milieu de contraction en présence de deux concentrations de  $\text{Mg}^{++}$  : 1 mM (a) et 3 mM (b).

La concentration des autres ions pour  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  est :  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 53 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 30,5 \text{ mM}$  pour  $\text{Mg}^{++} = 1 \text{ mM}$  et  $32,5 \text{ mM}$  pour  $\text{Mg}^{++} = 3 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de propionate.

Chaque point des courbes représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

Figure 28

Tension mécanique maximale développée par les myofilaments, exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ , en fonction de la concentration de  $\text{Ca}^{++}$ , en mM, du milieu de contraction en présence de trois concentrations différentes de  $\text{Mg}^{++}$  : 7 mM (a), 10 mM (b) et 15 mM (c).

La concentration des autres ions pour  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  est :  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 53 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 36,5 \text{ mM}$  pour  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$ ,  $39,5 \text{ mM}$  pour  $\text{Mg}^{++} = 10 \text{ mM}$  et  $44,5 \text{ mM}$  pour  $\text{Mg}^{++} = 15 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de propionate.

Chaque point des courbes représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

Cependant, le fait de modifier la concentration en ions divalents des solutions entraîne une variation de la force ionique et de la tonicité de ces milieux. En fait LÄNNERGRÉN et NOTH (1972) parlent d'un effet direct de l'hypertonie sur le mécanisme activateur et relaxant du muscle. De même, en ce qui concerne les fibres musculaires ayant subi divers traitements, il est montré, notamment sur les fibres pelées, que l'espace interfilamentaire est affecté par la force ionique, en modifiant les forces électrostatiques entre les filaments (APRIL et coll., 1972). La force ionique intervient sur le maximum de tension développée et une augmentation de cette force ionique de 0,10 à 0,40 provoque une diminution de la tension développée par les fibres musculaires glycélinées de lapin ; quant aux solutions hypertoniques, elles exercent des effets sur les protéines contractiles du muscle (HOMSHER et coll., 1974). Une réduction de la tension activée par le  $\text{Ca}^{++}$  au niveau du muscle extrait par le glycérol, avec une force ionique élevée est par ailleurs montrée par HOMSHER (1969) ; cité par GORDON et coll. (1973) et HOMSHER et coll. (1974), pour des valeurs de force ionique similaire à celles observées pour les fibres pelées par GORDON et coll. (1973). De même, une réduction de la force mécanique activée par le  $\text{Ca}^{++}$  et développée par des fibres pelées est observée lorsque la concentration en KCl passe de 0 à 280 mM (THAMES et coll., 1974). Une diminution de la tension développée par les myofilaments est également observée lors d'un accroissement de la force ionique par FABIATO et FABIATO (1976). Sur la fibre pelée d'écrevisse, APRIL et BRANDT (1973) montrent, de même, une diminution régulière de la tension lors de l'accroissement de la force ionique, diminution similaire à celle obtenue sur la fibre intacte (la tension étant induite dans ce cas par microinjection de  $\text{Ca}^{++}$  ou, par la caféine). La force ionique affecte ainsi le développement de la tension du muscle, comme elle affecte la transformation chimico-mécanique du couplage excitation-contraction. Toutefois, SOLARO et coll. (1976) montrent que la liaison du  $\text{Ca}^{++}$  par les filaments fins et la myosine n'est pas affectée par un changement de la force ionique de 0,05 à 0,14 M en absence de Mg ATP, alors qu'en présence de Mg ATP, le  $\text{Ca}^{++}$  lié augmente quand la force ionique diminue. De même, WEBER et HERZ (1963) constatent une diminution de  $\text{Ca}^{++}$  lié aux myofibrilles lorsque la force ionique est augmentée. D'autre part, la tension de repos des fibres musculaires extraites au glycérol montre également une dépendance vis-à-vis de la force ionique. Ainsi, HERBST et PIONTEK (1974) indiquent que la tension de repos d'une telle

préparation diminue avec l'accroissement de la force ionique et sont, de ce fait, en accord avec les résultats de GORDON et coll. (1973) qui précisent que l'accroissement de la force ionique diminue la tension de repos des fibres pelées de grenouille.

Toutefois, la force ionique ainsi que l'activité des ions en solution qui peuvent être calculées par la formule de DEBYE-HÜCKEL pose un problème complexe dans la mesure où il est bien certain qu'en utilisant des ions tels que  $\text{ATP}^{--}$  et  $\text{SO}_4^{--}$ , il se crée des liaisons, notamment entre  $\text{ATP}$  et  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{H}^+$  ; de même entre  $\text{SO}_4^{--}$  et  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  ou  $\text{K}^+$ . D'autre part, l'utilisation de l'ion  $\text{K}^+$  pour ajuster ou modifier la force ionique d'un milieu n'est pas, pour l'étude de l'activation myofibrillaire, un moyen idéal dans la mesure où GLENN L. KERRICK et DONALDSON (1972) précisent que le  $\text{K}^+$  est lié à un site de l'actine et que les variations de la concentration en  $\text{K}^+$  sont vraisemblablement la cause d'effets sur la liaison du  $\text{Mg}^{++}$  et du  $\text{Ca}^{++}$  sur leur site respectif.

Quoiqu'il en soit, au niveau de notre préparation, en utilisant le même principe que pour l'étude de l'activité ATPasique, l'ensemble des milieux testés au niveau de l'activité mécanique ne montre qu'une variation de force ionique de 0,210 à 0,280 entre le milieu le plus pauvre et celui le plus riche en ions divalents à savoir, d'une part,  $\text{Ca}^{++} = 0,125 \text{ mM}$  et  $\text{Mg}^{++} = 1 \text{ mM}$  et, d'autre part,  $\text{Ca}^{++} = 4 \text{ mM}$  et  $\text{Mg}^{++} = 15 \text{ mM}$ . De ce fait, en se référant à la courbe théorique de la figure 13, il est possible de voir que l'activité des cations divalents varie très peu et que les variations de tension observées ne peuvent être reliées aux variations de l'activité de ces ions. La variation de l'activité du  $\text{Ca}^{++}$  pour une concentration donnée de  $\text{Mg}^{++}$  dépend donc directement de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  du milieu. Les résultats montrent donc ici un effet propre des ions sur le mécanisme contractile, en bon accord avec celui observé précédemment en ce qui concerne l'activité ATPasique de ces myofibrilles. Rappelons que pour cette dernière, a été mise en évidence (chapitre précédent), en plus du rôle primordial des cations divalents, une participation non moins importante des cations monovalents, notamment  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , ainsi que des anions (chlorure, sulfate, méthylsulfate et nitrate) lors de la réaction enzymatique permettant l'hydrolyse de l'ATP. Aussi, apparaît-il maintenant indispensable de vérifier si ces ions ont un effet comparable au niveau de l'activation du mécanisme contractile.

## 2.2. Effets propres des cations monovalents et des anions

L'influence de ces cations monovalents et anions a déjà fait l'objet d'études au niveau de diverses préparations musculaires. C'est ainsi que GORDON et coll. (1973) trouvent qu'en présence de  $\text{Cl}^-$ , la même activation mécanique est obtenue avec le  $\text{K}^+$  ou le  $\text{Na}^+$ . De façon similaire, les cellules cardiaques pelées sont, du point de vue de leur contraction, insensibles au rapport  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  dans le milieu de perfusion ainsi qu'à la substitution du  $\text{Cl}^-$  par du propionate ou du méthylsulfate (FABIATO et FABIATO, 1972, 1973, 1976). Le  $\text{K}^+$  influence toutefois la tension développée par les fibres glycélinées de psoas de lapin. Aussi, BOWEN et MANDELKERN (1970) montrent que le raccourcissement est plus important (environ 20 p. 100) en présence de 0,04 M de KCl qu'en son absence, pour une concentration déterminée de  $\text{Mg}^{++}$ . Sur ces mêmes fibres glycélinées de psoas de lapin, JACOBS et GUTHE (1970) trouvent, en ce qui concerne les anions, une tension développée moins importante suivant la série  $\text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$ . GORDON et coll. (1973) montrent des variations de tension développée par les fibres musculaires pelées de grenouille, en présence de  $\text{K}^+$ , pour des forces ioniques identiques, selon qu'ils utilisent comme anions du  $\text{Cl}^-$ , du  $\text{Br}^-$ , du  $\text{SO}_4^{--}$  ou du propionate. Ces auteurs trouvent un ordre d'inhibition de la tension qui correspond à la séquence  $\text{C}_2\text{H}_5\text{COO}^- \simeq \text{SO}_4^{--} < \text{Cl}^- < \text{Br}^-$ . De même, sur la fibre pelée d'écrevisse, SORENSON et coll. (1973) (voir GORDON et coll., 1973) montrent que le  $\text{Cl}^-$  est plus efficace à réduire la tension que le propionate.

### 2.2.1. Effets des cations monovalents à $\text{Cl}^-$ normale

Précisons dès le départ que pour l'ensemble des milieux testés au niveau des myofilaments, les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$  lorsqu'ils sont présents, sont mis sous forme de propionate ; les ions  $\text{Mg}^{++}$  sous forme de sulfate et les ions  $\text{K}^+$ , en partie, pour 53 mM sous forme de chlorure, l'autre partie étant sous forme de sulfate. L'utilisation de 53 mM de chlorure de  $\text{K}^+$  est faite dans le but de maintenir la concentration normale en ions  $\text{Cl}^-$  et oblige donc à utiliser des sels autres que des chlorures.

Au niveau de notre préparation de myofilaments de crabe, les cations monovalents interviennent également en ce sens qu'ils modifient la



tension développée (BRULE et GUILBAULT, 1975) tout comme par ailleurs, ils favorisent ou inhibent l'activité ATPasique de ces mêmes myofilaments (chapitre II). Ainsi, la figure 29 montre que la tension développée, en fonction de la concentration du milieu environnant en  $Mg^{++}$ , est accrue en absence de  $Na^+$  dans ce milieu. Si en présence de  $Na^+$ , la tension développée

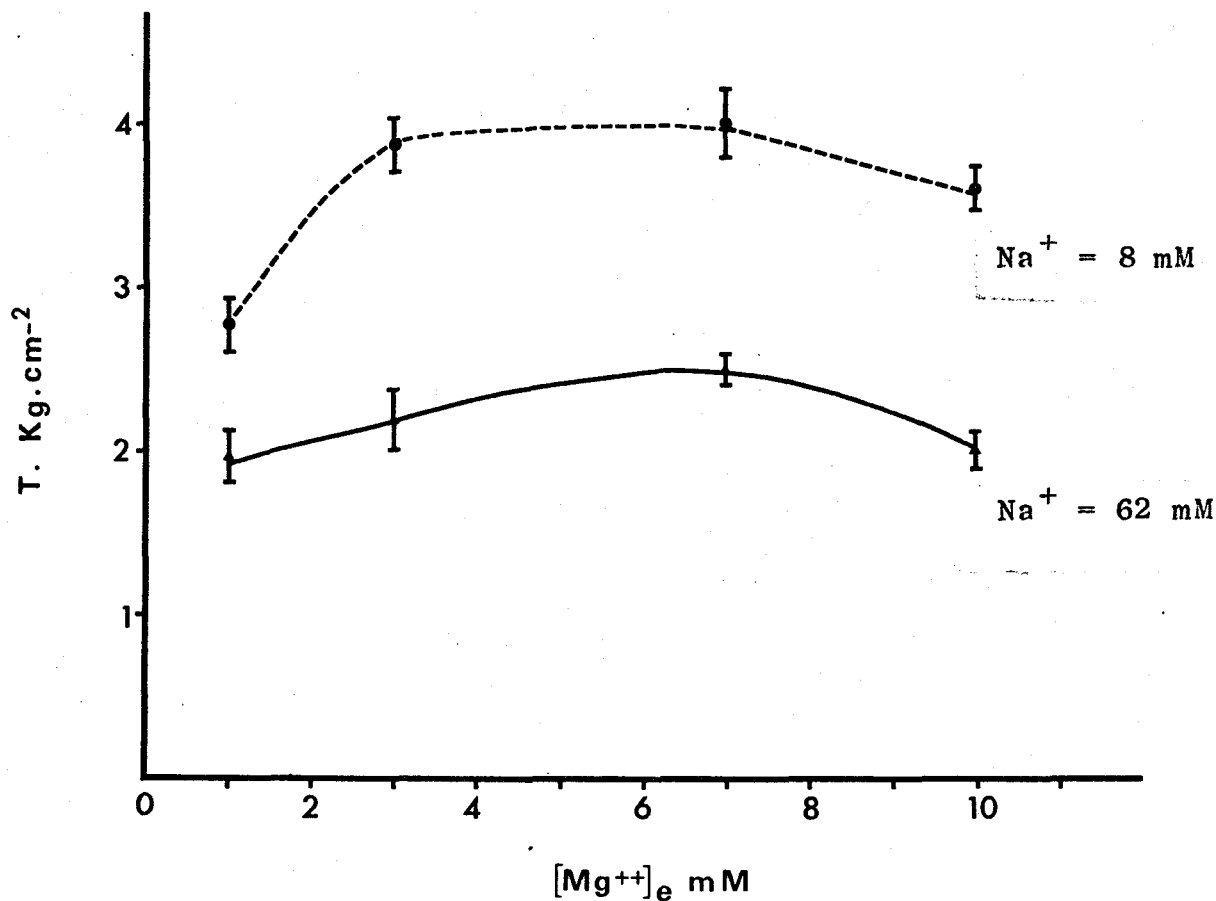


Figure 29

Tension mécanique maximale développée par les myofilaments, exprimée en Kg.cm<sup>-2</sup>, en fonction de la concentration de  $Mg^{++}$ , en mM, du milieu de contraction en présence de  $Na^+$  (62 mM ou 8 mM).

La concentration du milieu de référence est :  $Ca^{++} = 1$  mM,  $Mg^{++} = 7$  mM ;  $Na^+ = 62$  mM ;  $K^+ = 112$  mM ;  $Cl^- = 53$  mM ;  $SO_4^{--} = 36,5$  mM ;  $CH_3CH_2COO^- = 56$  mM ; ATP = 4 mM. La variation de la concentration en  $Mg^{++}$  est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en  $SO_4^{--}$  et l'abaissement de la concentration en  $Na^+$  est obtenu avec l'abaissement de la concentration en  $CH_3CH_2COO^-$ .

Chaque point des courbes représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

s'accroît progressivement lorsque la concentration en  $Mg^{++}$  du milieu passe de 1 à 7 mM pour décroître ensuite, il se trouve, qu'en absence de  $Na^+$ , le maximum de tension est atteint pour une concentration moindre de  $Mg^{++}$ , comprise entre 3 et 7 mM. Toutefois, quelle que soit la concentration de  $Mg^{++}$  (variant de 1 à 10 mM), la tension développée par les myofilaments est toujours supérieure en absence de  $Na^+$ . Si en présence de  $Na^+$ , la tension atteint  $2,5 \text{ Kg.cm}^{-2}$  (valeur conforme à celle enregistrée lors de la contracture potassique), elle passe à  $4 \text{ Kg.cm}^{-2}$  en absence de  $Na^+$  pour une concentration identique de  $Mg^{++}$  soit 7 mM. Toutefois, l'influence du  $Na^+$  corrélée au  $Mg^{++}$  n'est pas la seule qui puisse être observée comme le montre la figure 30 qui donne des exemples d'enregistrements obtenus, en présence de  $Mg^{++}$  (à une concentration normale) avec des concentrations variées de  $Na^+$  et  $K^+$ . En effet, la figure illustre les effets de quatre milieux, à savoir, la forte diminution du  $Na^+$  dans le milieu de référence défini au paragraphe précédent ( $ATP = 4 \text{ mM}$  ;  $Ca^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $Mg^{++} = 7 \text{ mM}$ ), ou l'absence de  $K^+$  ou encore l'absence à la fois de  $K^+$  et de  $Na^+$ . La figure 31 résume les effets de ces différents milieux et montre que l'absence d'un seul des deux cations monovalents  $Na^+$  ou  $K^+$  provoque le développement d'une tension plus importante, égale ou proche de  $4 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Cette valeur de la tension est, elle-même, proche de la tension maximale que peut développer la fibre musculaire striée de crabe lorsqu'elle est soumise, en condition plus ou moins hypercalciqique, en présence ou en absence de  $Na^+$ , à une activation maximale par l'apport de  $K^+$  externe, ainsi que cela sera montré au chapitre suivant. Par contre, l'absence à la fois de  $Na^+$  et de  $K^+$  entraîne une diminution de la tension puisque, dans ces conditions, les myofilaments développent une tension inférieure à la normale ( $2 \text{ Kg.cm}^{-2}$  contre  $2,5 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ). Ainsi, pour atteindre une contraction maximale, la présence d'une seule espèce de cation monovalent ( $Na^+$  ou  $K^+$ ) est nécessaire. De même, comme cela a été vu au chapitre II, l'activité ATPasique des protéines de structure est renforcée lorsque la concentration de l'un des 2 ions  $Na^+$  ou  $K^+$  est réduite. Il faut cependant, de plus, signaler que si pour l'étude de la contraction des myofilaments, l'absence de  $Na^+$  et  $K^+$  simultanée s'est effectuée avec un maintien de la concentration en  $Cl^-$ , il n'en a pas été de même pour la mesure de l'activité ATPasique. Dans ce dernier cas, en effet, la réduction de la concentration en  $Na^+$  et  $K^+$  est accompagnée d'une diminution de la concentration en  $Cl^-$ .

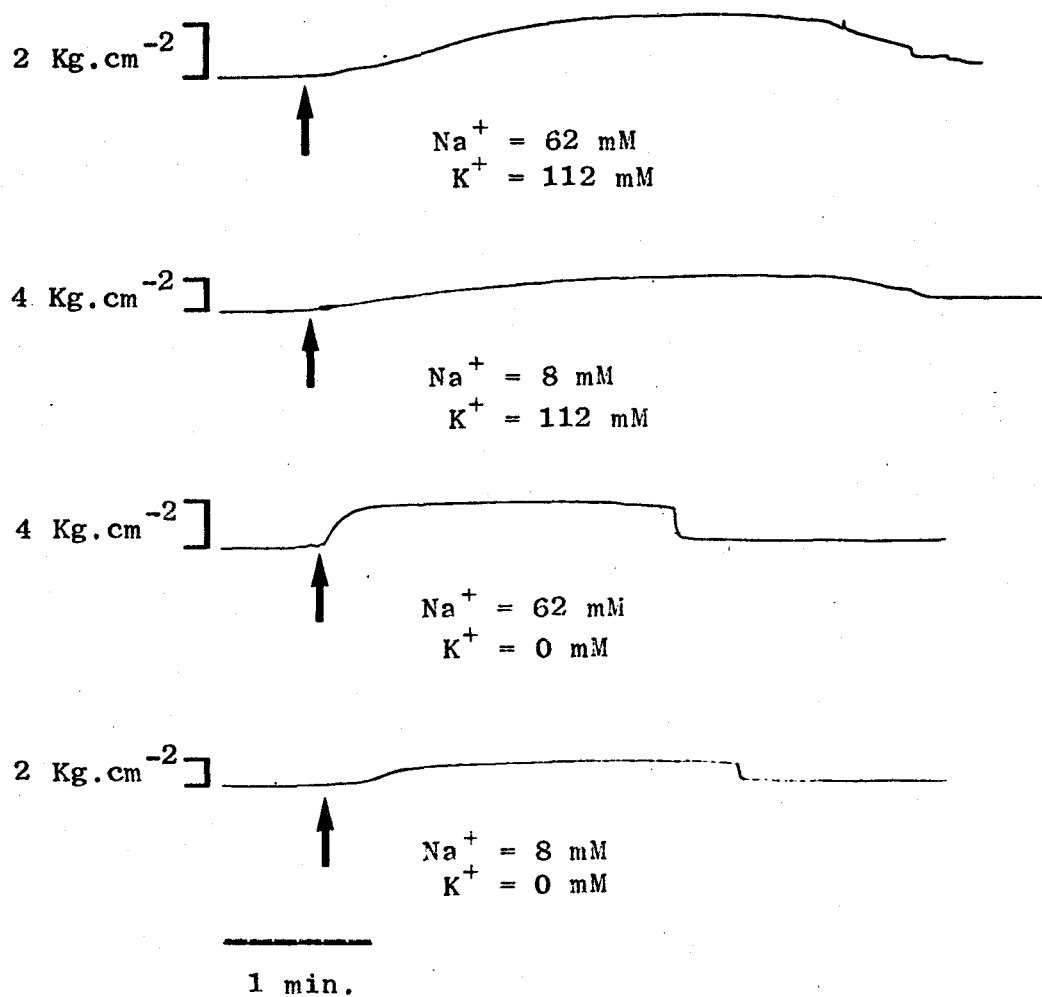


Figure 30

Exemples d'enregistrement de la contraction maximale des myofilaments consécutive à l'application de milieux de différentes concentrations en K<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>.

La concentration du milieu de référence est : Ca<sup>++</sup> = 1 mM ; Mg<sup>++</sup> = 7 mM ; Na<sup>+</sup> = 62 mM ; K<sup>+</sup> = 112 mM ; Cl<sup>-</sup> = 53 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 36,5 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 56 mM ; ATP = 4 mM. La variation de la concentration en Na<sup>+</sup> est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>. Quant à la suppression des ions K<sup>+</sup>, elle est obtenue par une diminution de la concentration des ions SO<sub>4</sub><sup>--</sup> (suppression du K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et remplacement du KCl de la solution de référence par du chlorhydrate de choline).

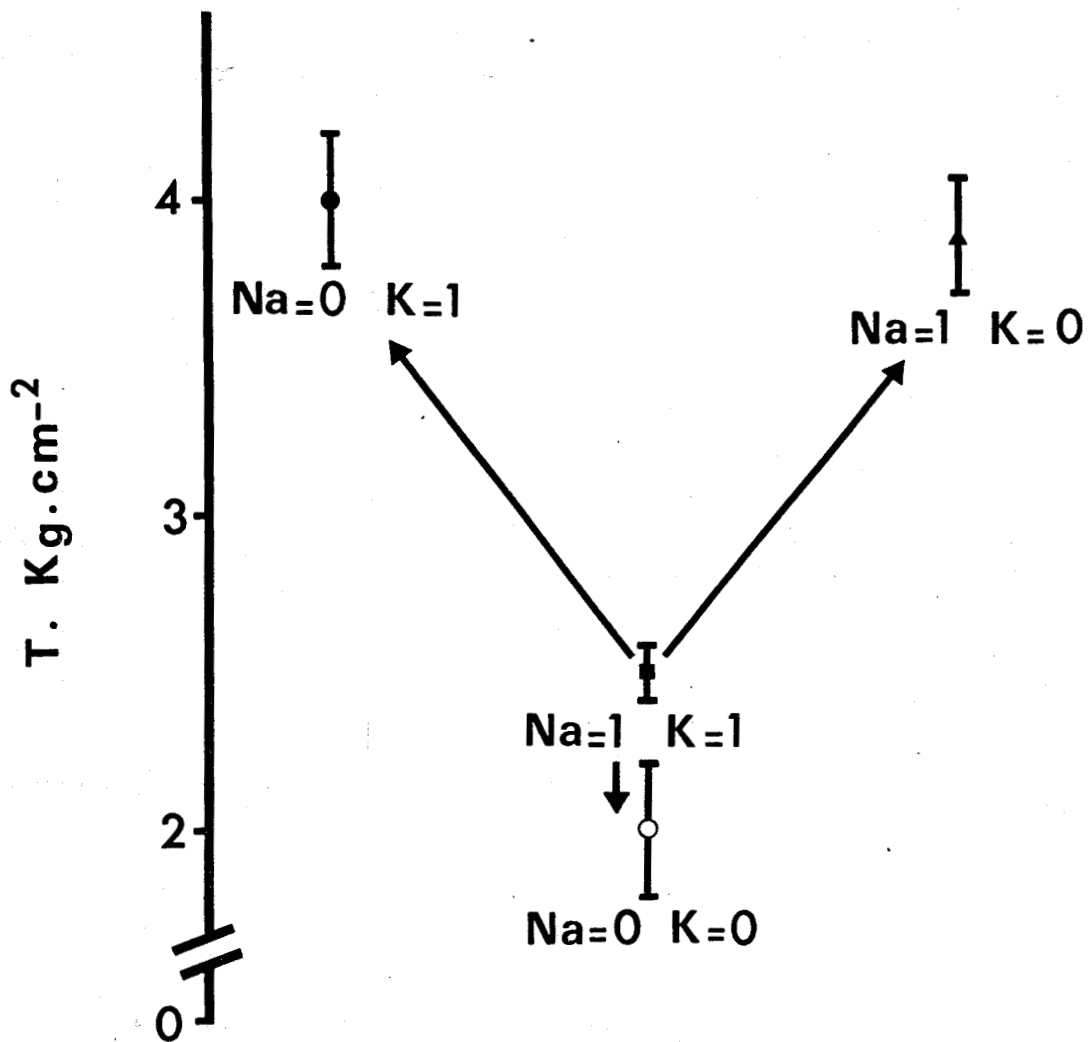


Figure 31

Résumé des effets de la variation des concentrations en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sur la contraction maximale des myofilaments.

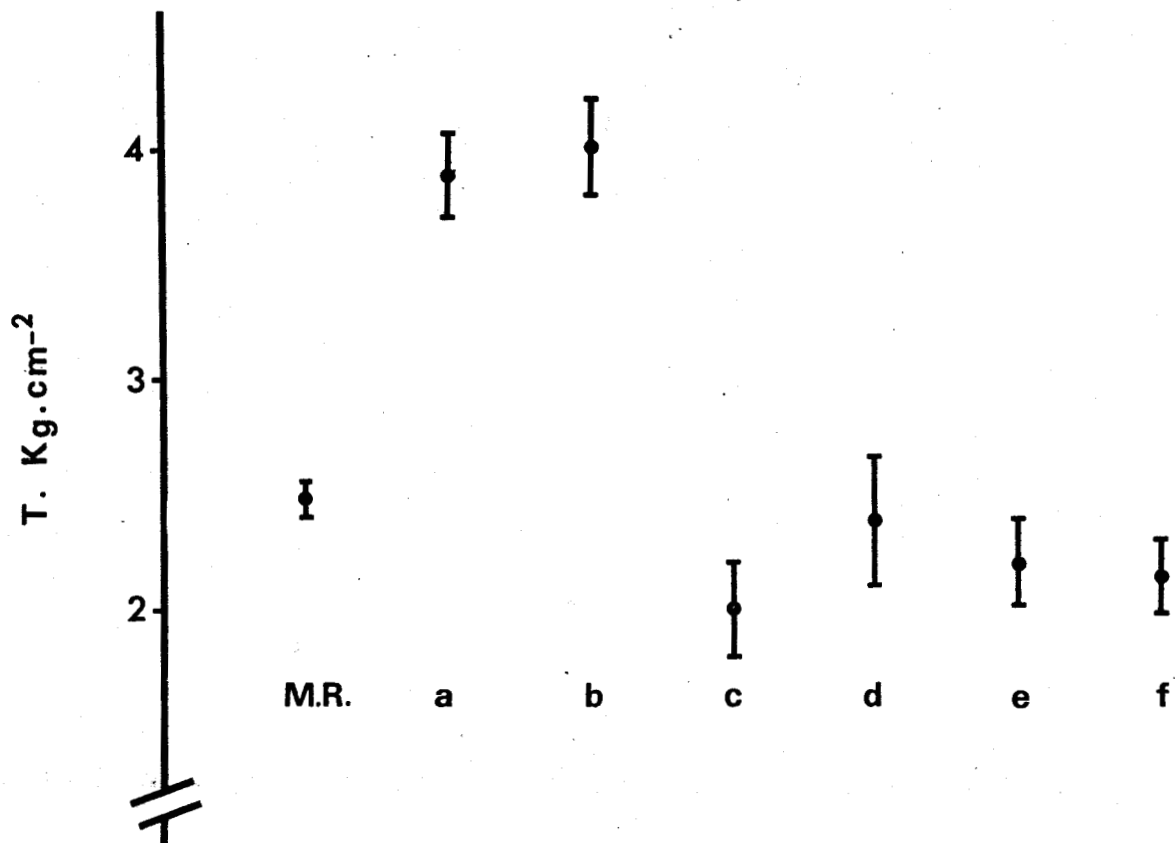
Le milieu de référence  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  et  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  est représenté par le point indiqué  $\text{Na} = 1$   $\text{K} = 1$ . Les points  $\text{Na} = 0$   $\text{K} = 0$  correspondent à des concentrations respectives de  $8 \text{ mM}$  et  $0 \text{ mM}$ . Dans le cas de suppression du  $\text{K}^+$  du milieu, l'ion  $\text{Cl}^-$  est amené sous forme de chlorhydrate de choline. Pour plus de détail, voir légende de la figure 30.

Chaque point représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

Là encore, lors de l'étude de la contraction des myofilaments, les différences de teneur en ions sont accompagnées de modifications de la

force ionique des divers milieux testés. C'est ainsi que, pour les effets des milieux présentés à la figure 31, il existe des variations sensibles de la force ionique. En effet, si celle du milieu de référence est de 0,239, en absence de  $\text{Na}^+$  elle est de 0,185, en absence de  $\text{K}^+$  (une partie du  $\text{K}^+$  étant remplacé par le chlorure de choline) elle est de 0,150 alors qu'en absence de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{K}^+$  elle n'est que de 0,096. Partant de ces valeurs, et en se référant à la figure 13, pour la courbe correspondant à une concentration de  $\text{Ca}^{++}$  de 1 mM, il est possible de constater que l'activité de l'ion  $\text{Ca}^{++}$  augmente sensiblement lorsque la force ionique diminue assez fortement. L'augmentation importante de l'activité du  $\text{Ca}^{++}$ , simultanée à celle du  $\text{Mg}^{++}$ , pourrait, peut être, intervenir en faveur de la diminution de tension mécanique observée. Quoiqu'il en soit, un effet propre des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  n'est pas à négliger. Et, comme cela va être montré, ces ions interviennent en tant que tel, en tant qu'espèce ionique particulière et non pas en tant que cations monovalents. En effet, si le  $\text{Li}^+$  et le  $\text{Rb}^+$  sont utilisés comme substituts du  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , aucune influence de ces cations ne peut être relevée au niveau de la contraction des myofilaments ainsi que le montre la figure 32. Cette figure permet de constater qu'en partant de la tension obtenue en milieu de référence (M.R.), la suppression du  $\text{K}^+$  (présence seule de  $\text{Na}^+$ ) provoque un accroissement considérable de la tension (milieu a), tout comme la suppression du  $\text{Na}^+$  (présence seule de  $\text{K}^+$ ) (milieu b). Par contre, la suppression des deux cations  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  (milieu c) entraîne une diminution de la tension développée ; dans ce cas, l'ion choline est utilisé en remplacement du  $\text{Na}^+$  (seul présent dans le milieu a). De la même manière, le remplacement mM à mM du  $\text{Na}^+$  du milieu a par des ions  $\text{Li}^+$  (milieu d) ne permet pas le développement d'une tension plus élevée puisque le niveau atteint est même inférieur à celui de référence (M.R.). De façon similaire, le remplacement du  $\text{K}^+$  (du milieu b) par  $\text{Li}^+$  (milieu e) ou  $\text{Rb}^+$  (milieu f), ne permet que le développement d'une tension inférieure à celle de référence. De ce fait, le  $\text{Li}^+$ , tout comme le  $\text{Rb}^+$ , ne peuvent être utilisés comme substitut du  $\text{K}^+$  pour permettre le développement d'une tension maximale équivalente à 4 Kg.cm<sup>-2</sup>.

Cependant, là encore, la modification de la composition des solutions a entraîné des variations de la valeur de la force ionique qui, cette fois cependant, sont très faibles. En effet, si la force ionique calculée pour l'absence de  $\text{K}^+$  (milieu a) est de 0,150, elle n'est que de 0,155



pour les milieux qui renferment 112 mM de Cl Li ou 112 mM de Cl Rb (respectivement milieu e et f). Ainsi, la chute de tension enregistrée, ne peut cette fois être interprétée sur la base d'une modification de la force ionique et par conséquent de l'activité des ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  en solution. Cette variation de tension, enregistrée en absence de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{K}^+$  ne peut, de même, être expliquée par l'existence d'une concentration optimale en cations monovalents puisque des teneurs identiques en  $\text{Na}^+$  ou en  $\text{Li}^+$  par exemple, donnent des tensions différentes. De ce fait, c'est bien la nature du cation monovalent présent dans la solution qui joue le rôle le plus important. En effet, la présence seule de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{K}^+$  augmente la tension développée par les myofilaments, ces ions interviennent en tant que tels et ne peuvent être substitués par la choline, le  $\text{Li}^+$  ou le  $\text{Rb}^+$ . De plus, leur présence ( $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ) est indispensable pour le développement de la tension maximale, mais la présence des deux ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) doit résulter dans l'existence d'une compétition qui aboutit, de ce fait, au développement



Figure 32

Résumé des effets de la suppression des ions  $\text{Na}^+$  et/ou  $\text{K}^+$  et de leur substitution par des ions choline<sup>+</sup>,  $\text{Rb}^+$  ou  $\text{Li}^+$  sur la tension mécanique maximale développée par les myofilaments.

La tension maximale développée dans les conditions de référence est indiquée par le point noté M.R.. La composition de ce milieu de référence est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 53 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 36,5 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ .

Le point a correspond à une suppression de  $\text{K}^+$  et à une diminution simultanée de  $\text{SO}_4^{--}$  (les ions  $\text{Cl}^-$  étant amenés sous forme de chlorhydrate de choline) ; le point b correspond à une réduction de  $\text{Na}^+$  (de 62 à 8 mM) avec une variation simultanée de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ .

Pour le point c, la composition de la solution de contraction est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 8 \text{ mM}$  ; choline<sup>+</sup> = 54 mM ;  $\text{Cl}^- = 54 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 2 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . Les ions choline<sup>+</sup> sont alors substitués aux ions  $\text{Na}^+$  manquants (comparaison avec le point b).

Pour le point d, la composition de la solution de contraction est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 8 \text{ mM}$  ;  $\text{Li}^+ = 54 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 54 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 2 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . Les ions  $\text{Li}^+$  sont alors substitués aux ions  $\text{Na}^+$  manquants (comparaison avec le point b).

Pour le point e, la composition de la solution de contraction est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 8 \text{ mM}$  ;  $\text{Li}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 2 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . Les ions  $\text{Li}^+$  sont alors substitués aux ions  $\text{K}^+$  manquants (comparaison avec le point a).

Pour le point f, la composition de la solution de contraction est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 8 \text{ mM}$  ;  $\text{Rb}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 2 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . Les ions  $\text{Rb}^+$  sont alors substitués aux ions  $\text{K}^+$  manquants (comparaison avec le point a).

Les différents points de cette figure peuvent se comparer deux à deux. Chaque point représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

d'une tension moindre. La concentration en ces ions activateurs  $\text{K}^+$  intervient de même au niveau du développement de la tension mécanique par les myofilaments ainsi que l'atteste la figure 33. Les concentrations en  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sont maintenues constantes à leur valeur de référence précédemment définies à savoir respectivement 54 et 53 mM ; l'apport d'ions  $\text{K}^+$  au delà de la concentration normale est réalisé sous forme de sulfate. Il est ainsi possible de constater qu'en augmentant progressivement la teneur du milieu environnant en  $\text{K}^+$ , en présence de  $\text{Na}^+$ , la tension développée diminue (notamment pour les valeurs  $\text{K}^+ = 0$  et  $\text{K}^+ = 53 \text{ mM}$  où la concentration en ions  $\text{SO}_4^{--}$  n'a pas été modifiée simultanément). Pour ces différentes solutions, la force ionique calculée passe de 0,150 en absence de  $\text{K}^+$  à 0,322

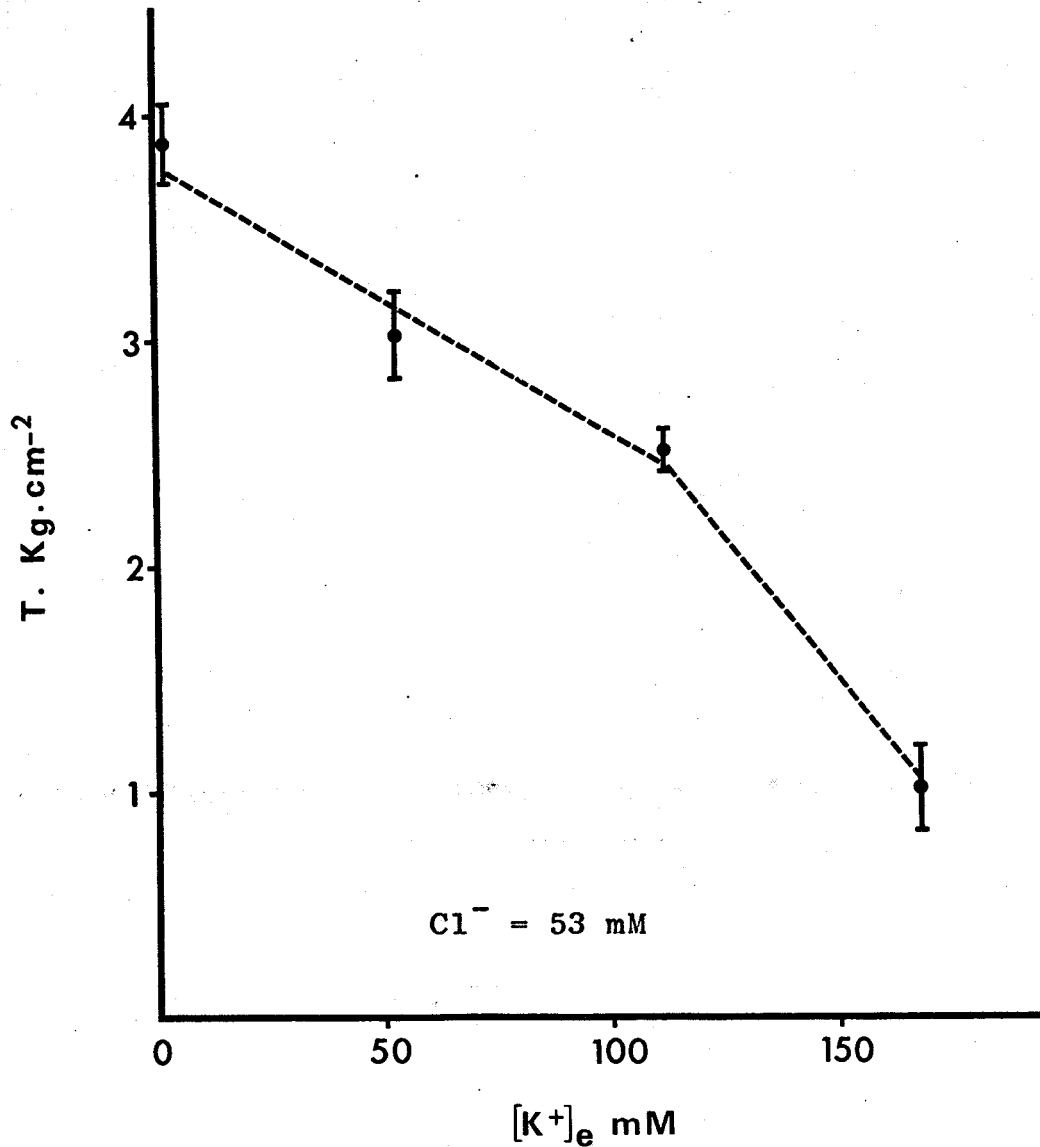


Figure 33

Tension mécanique maximale développée par les myofilaments, exprimée en Kg.cm<sup>2</sup>, en fonction de la concentration de K<sup>+</sup>, en mM, du milieu de contraction.

La concentration du milieu de référence est : Ca<sup>++</sup> = 1 mM ; Mg<sup>++</sup> = 7 mM ; Na<sup>+</sup> = 62 mM ; K<sup>+</sup> = 112 mM ; Cl<sup>-</sup> = 53 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 36,5 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 56 mM ; ATP = 4 mM. La variation de la concentration en K<sup>+</sup> est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en SO<sub>4</sub><sup>--</sup>. Pour le milieu K<sup>+</sup> = 0 mM, les ions Cl<sup>-</sup> sont apportés sous forme de chlorhydrate de choline.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  (n = 6).



en présence de 168 mM de  $K^+$ . Cette variation de force ionique s'accompagne, comme le montre la figure 13, d'une modification de l'activité du  $Ca^{++}$  et du  $Mg^{++}$  en solution. Cependant, cette variation d'activité ne peut à elle seule expliquer la diminution importante de tension. En effet, des variations similaires de l'activité de ces cations divalents, par modification de leur concentration n'entraînent pas d'aussi grands changements dans le niveau maximal de tension développée par les myofilaments (voir par exemple figures 27, 28).

### 2.2.2. Effets des ions $K^+$ à $[Cl^-] \times 2$ .....

La relation entre la tension et la concentration de  $K^+$  (Fig. 33) est cependant modifiée si la concentration en  $Cl^-$  est différente. Ainsi, comme le montre la figure 34, la tension ne diminue plus constamment avec l'augmentation de la concentration en  $K^+$  lorsque la teneur en  $Cl^-$  du milieu est multipliée par 2 (106 mM). Avec une concentration en  $K^+$  normale (112 mM), la tension de référence diminue lorsque la  $[Cl^-]$  passe de 53 à 106 mM. Ainsi, les myofilaments ne développent plus qu'une tension moyenne de  $1,92 \pm 0,23 \text{ Kg.cm}^{-2}$  alors qu'ils développent une tension de  $2,5 \pm 0,08 \text{ Kg.cm}^{-2}$  en condition normale. De façon encore plus marquée que précédemment (Fig. 33), la tension diminue lorsque la concentration en  $K^+$  augmente. Par contre, à l'inverse, lorsque la concentration en  $K^+$  diminue et passe à 53 mM, la tension chute alors qu'avec une concentration en  $Cl^-$  normale (53 mM) la tension développée par les myofilaments est accrue (la concentration en  $SO_4^{--}$  étant identique) (comparaison des figures 33 et 34). Ainsi donc, l'ion  $Cl^-$ , de par sa concentration, influence la tension mécanique dans la mesure où une augmentation de sa concentration provoque une diminution de cette tension. De plus, il semble nécessaire de maintenir un certain équilibre entre le taux de  $K^+$  et de  $Cl^-$  ; en effet, une réduction du  $K^+$  par rapport à la normale entraîne une diminution considérable de la tension lorsque la concentration de  $Cl^-$  est multipliée par 2.

La chute de tension observée pour la concentration en  $Cl^-$  multipliée par 2 pour les différents teneurs en  $K^+$  ne peut là encore s'expliquer par des variations d'activité du  $Ca^{++}$  ou du  $Mg^{++}$  en solution ; les modifications de la force ionique sont en effet du même ordre que celles obtenues avec une concentration en  $Cl^-$  normale. L'ion  $Cl^-$  semble donc intervenir en

tant qu'espèce ionique capable de modifier la réponse contractile des myofilaments isolés. Aussi, a-t-il paru nécessaire, tout comme dans le cas de la mesure de l'activité ATPasique, d'étudier la tension développée en absence totale de  $\text{Cl}^-$ .

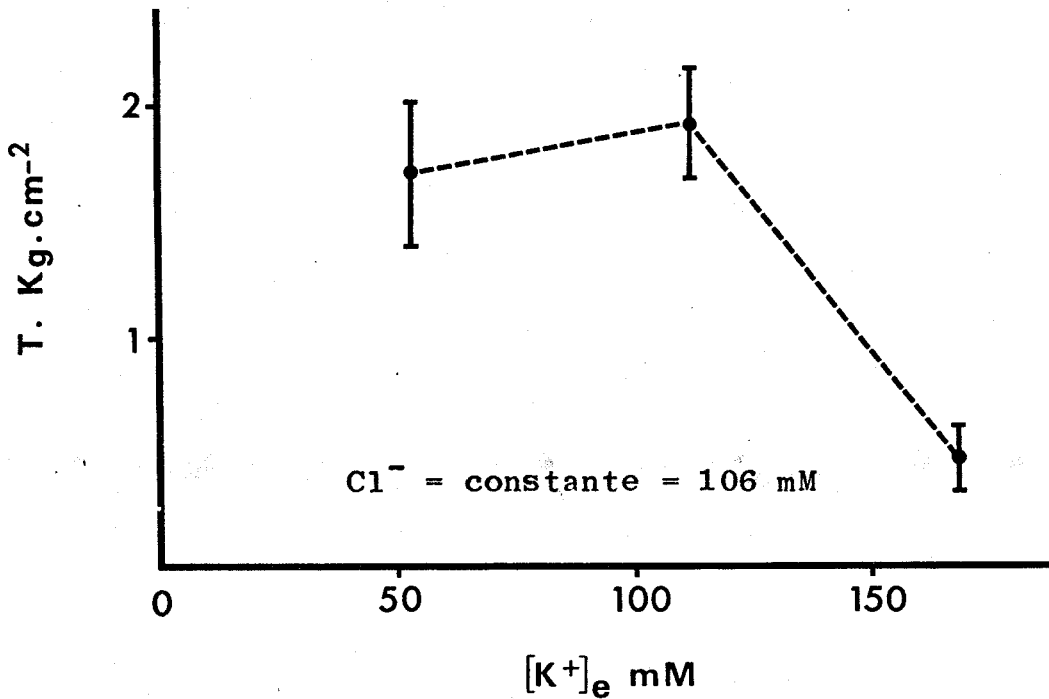


Figure 34

Tension mécanique maximale développée par les myofilaments, exprimée en  $\text{Kg.cm}^2$ , en fonction de la concentration de  $\text{K}^+$ , en mM, du milieu de contraction, en présence d'une concentration de  $\text{Cl}^-$  double de la normale, soit 106 mM.

Les concentrations en ions  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  et ATP sont celles de référence, soit respectivement : 1 mM, 7 mM, 62 mM et 4 mM. La variation de la concentration en  $\text{K}^+$  est obtenue avec une modification simultanée des concentrations en  $\text{SO}_4^{--}$  et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$  : pour  $\text{K}^+ = 53$  mM,  $\text{SO}_4^{--} = 7$  mM et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 3$  mM ; pour  $\text{K}^+ = 112$  mM,  $\text{SO}_4^{--} = 10$  mM et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56$  mM ; pour  $\text{K}^+ = 168$  mM,  $\text{SO}_4^{--} = 38$  mM et  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56$  mM.

Pour le dernier milieu ( $\text{K}^+ = 168$  mM), la concentration en  $\text{SO}_4^{--}$  (38 mM) est sensiblement celle du milieu de référence (36,5 mM) (figure 33). La comparaison de la valeur de ces points montre donc l'effet sur la tension mécanique maximale de l'accroissement simultané des concentrations en  $\text{K}^+$  et en  $\text{Cl}^-$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

### 2.2.3. Effets des anions

Les tracés de la figure 35 donnent des exemples d'enregistrement de contraction obtenus en présence de sulfate, méthylsulfate ou nitrate utilisé comme substitut du  $\text{Cl}^-$ . Le remplacement du  $\text{Cl}^-$  par ces

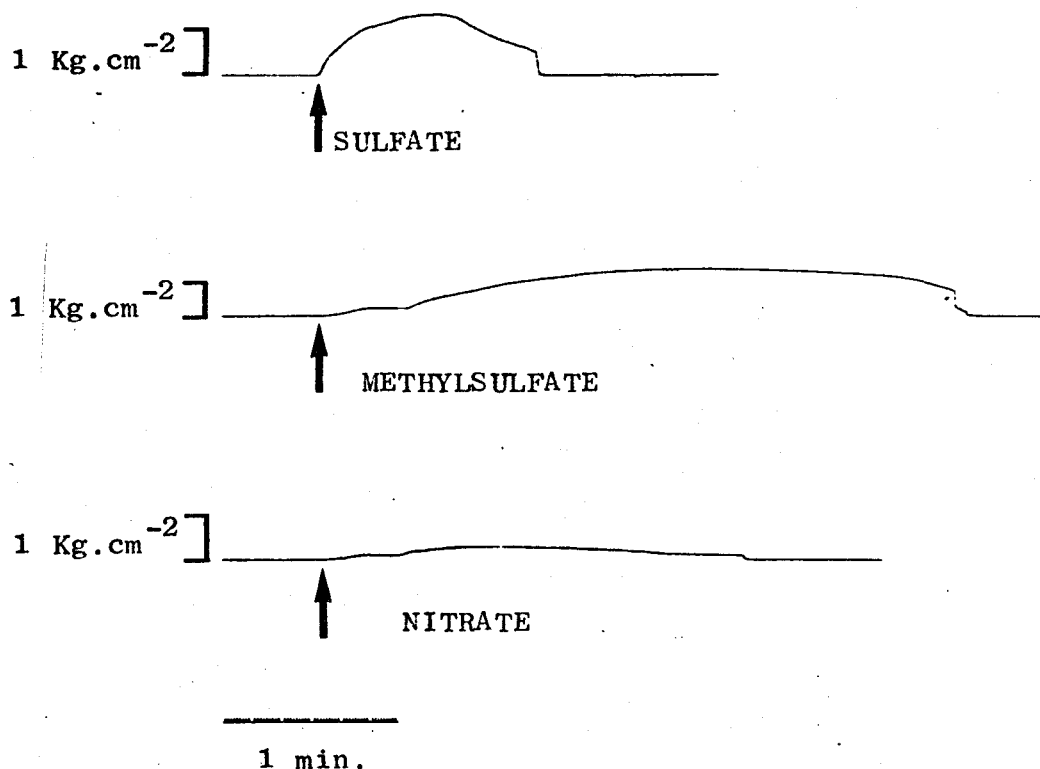


Figure 35

Exemples d'enregistrement de la contraction maximale des myofilaments consécutive à l'application du milieu de contraction de contenu anionique modifié, en absence d'ions  $\text{Cl}^-$ .

La concentration des ions du milieu de référence est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 53 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 36,5 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$ . Le  $\text{K}^+$  est apporté pour  $53 \text{ mM}$  sous forme de chlorure et pour  $59 \text{ mM}$  sous forme de sulfate.

Pour les enregistrements présentés et notés sulfate, méthylsulfate et nitrate, l'ensemble du  $\text{K}^+$  est apporté respectivement sous forme de sulfate, méthylsulfate et nitrate.

Les flèches indiquent le début de l'application de la solution de contraction.

différents anions entraîne une diminution de la tension de référence ; les tensions moyennes développées dans de telles conditions expérimentales sont données à la figure 36. Pour l'ensemble de ces solutions, les myofilaments

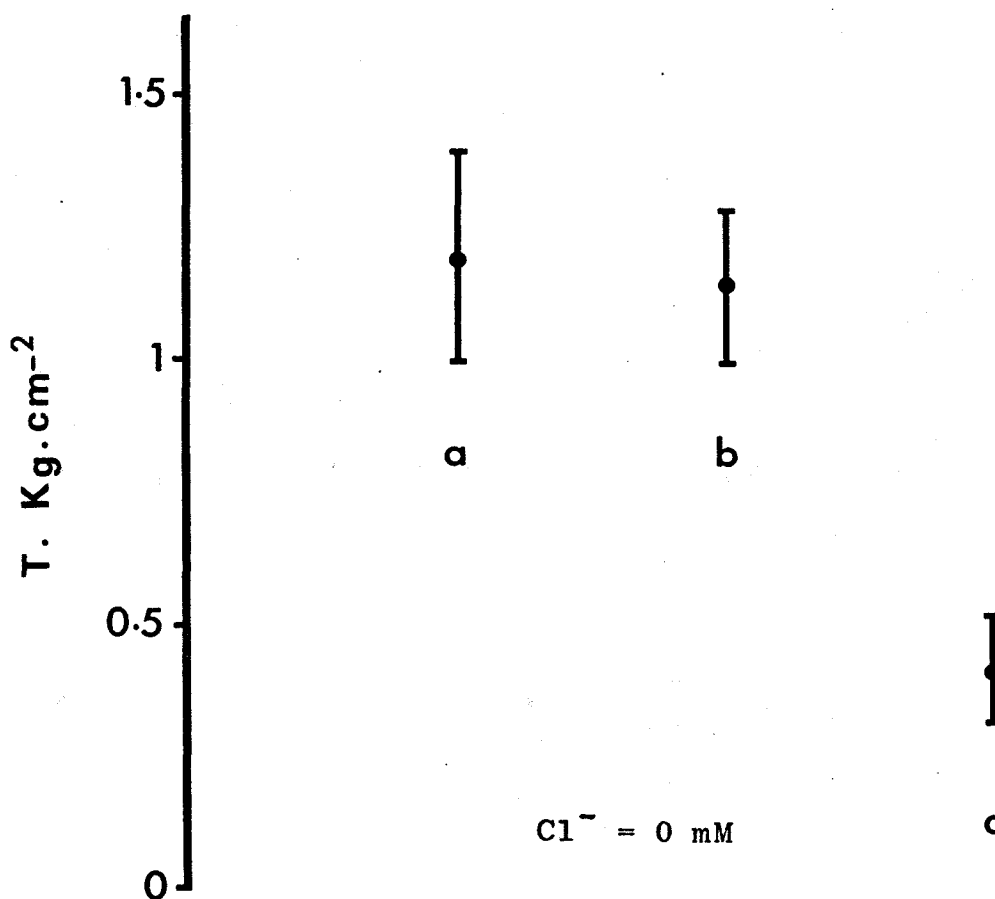


Figure 36

Résumé des effets de la substitution totale du chlore par le méthylsulfate (milieu a), le sulfate (milieu b) ou le nitrate (milieu c) sur la tension mécanique maximale développée par les myofilaments.

La concentration des ions des 3 solutions de contraction est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$  et, pour le milieu a : méthylsulfate = 112 mM, sulfate = 7 mM ; pour le milieu b : sulfate = 63 mM ; pour le milieu c : sulfate = 7 mM, nitrate = 112 mM.

Chaque point représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).



sont placés, dès l'application des solutions relaxantes, en absence de  $\text{Cl}^-$  et en présence de méthylsulfate (a), sulfate (b) ou nitrate (c), les concentrations en cations mono et divalents étant celles de référence. Ainsi, tout comme pour un accroissement de la concentration en  $\text{Cl}^-$  (x 2), une suppression du  $\text{Cl}^-$  de la solution entraîne une diminution, dans ce dernier cas, considérable, de la tension maximale développée par les myofilaments. L'ordre d'inhibition de la contraction des myofilaments de crabe par les différents anions utilisés comme substitut du  $\text{Cl}^-$  est ainsi : sulfate  $\simeq$  méthylsulfate  $<$  nitrate. La tension développée est dans l'ordre  $1,14 \pm 0,14$  ;  $1,19 \pm 0,20$  et  $0,42 \pm 0,10 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . L'ensemble de ces résultats tend à montrer l'existence d'un optimum de concentration pour l'ion  $\text{Cl}^-$ . De fait, si une concentration intermédiaire en  $\text{Cl}^-$ , soit 35 mM, est testée, selon la nature de l'anion mis en complément, des variations similaires de la tension sont observées et, comme l'atteste la figure 37, l'ordre du pouvoir d'inhibition est méthylsulfate  $<$  sulfate  $<$  nitrate. Les tensions développées lors de l'application de ces différents milieux sont intermédiaires entre celles enregistrées en absence totale de  $\text{Cl}^-$  et celles enregistrées en présence de 53 mM de  $\text{Cl}^-$ . Il semble bien ainsi qu'il existe pour le développement maximal de la tension, une concentration optimale de  $\text{Cl}^-$ , et que l'anion d'accompagnement, permettant de rétablir la concentration normale anionique, a une grande importance.

L'ensemble de ces résultats que ce soit en absence totale ou en présence de 35 mEq de  $\text{Cl}^-$ , ne peut là encore être interprété sur la base d'une modification de la force ionique et de l'activité des ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ . En effet, en milieu nitrate et méthylsulfate la force ionique est de 0,21, que ce soit en  $\text{Cl}^- = 0 \text{ mM}$  ou  $= 35 \text{ mM}$  ; et, en milieu sulfate elle est de 0,248 en  $\text{Cl}^- = 35 \text{ mM}$  et de 0,265 en  $\text{Cl}^- = 0 \text{ mM}$ . Ainsi, tout comme pour l'activité ATPasique, l'environnement ionique en cations monovalents et en anions est extrêmement important. Il influence donc l'activité ATPasique ainsi que le mécanisme contractile.

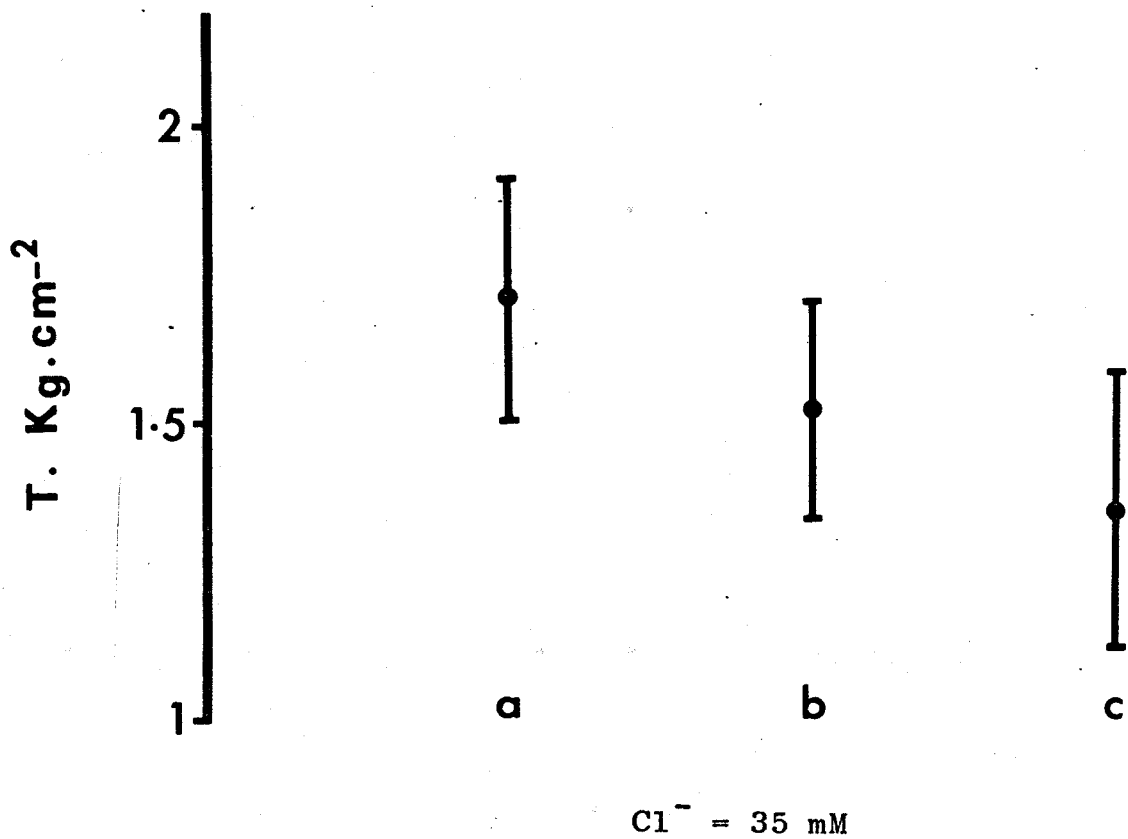


Figure 37

Résumé des effets de la substitution partielle du chlore (18 mM étant substituées) par le méthylsulfate (milieu a), le sulfate (milieu b) ou le nitrate (milieu c) sur la tension mécanique maximale développée par les myofilaments.

La concentration des ions de la solution de contraction est :  $\text{Ca}^{++} = 1 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 7 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 62 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 112 \text{ mM}$  ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 56 \text{ mM}$  ;  $\text{ATP} = 4 \text{ mM}$  et, pour le milieu a : chlore = 35 mM, méthylsulfate = 77 mM, sulfate = 7 mM ; pour le milieu b : chlore = 35 mM, sulfate = 45,5 mM ; pour le milieu c : chlore = 35 mM, nitrate = 77 mM, sulfate = 7 mM.

Chaque point représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 5$ ).

#### IV - CORRELATION ENTRE L'ACTIVITÉ ATPASIQUE ET L'ACTIVITÉ MÉCANIQUE DES MYOFILAMENTS - CONCLUSION

Une corrélation entre l'activité ATPasique de la myosine et la vitesse de raccourcissement de différents muscles de vertébrés et d'invertébrés est notamment montré par BARANY (1967). Toutefois, SEAGREN et coll. (1971) trouvent qu'un changement de l'état contractile du muscle cardiaque, induit pharmacologiquement, n'est pas nécessairement lié à un changement concomitant de l'activité ATPasique des protéines contractiles. D'autres bonnes corrélations entre l'hydrolyse de l'ATP et la tension moyenne des fibres sont cependant obtenues, notamment avec les fibres musculaires d'insectes par PYBUS et TREGGAR (1975). De même, BENDALL (1953) trouve que pour des fibres traitées au glycérol, brièvement ou longuement lavées en KCl isotonique, une basse activité ATPasique est associée à un faible raccourcissement tandis qu'une haute activité est associée à un grand raccourcissement. Toutefois, la relation entre le raccourcissement et l'activité ATPasique varie avec la longueur du sarcomère, la concentration de substrat, les concentrations de  $Mg^{++}$  et de  $Ca^{++}$  (TAKAUJI et HONIG, 1972). Le raccourcissement, ainsi que l'activité ATPasique sont observés avec les ions divalents tout comme avec le KCl ou le Li Br. Pour les ions monovalents, le maximum d'activité ATPasique coïncide avec la concentration qui produit le plus grand raccourcissement alors que pour les ions divalents, le maximum coïncide avec les concentrations qui produisent 20 p. 100 du raccourcissement maximal (BOWEN et MANDELKERN, 1970). Ces mêmes auteurs, en 1971, montrent, sans addition de cations divalents, qu'une grande tension peut être développée avec une hydrolyse négligeable d'ATP et concluent qu'une grande quantité d'énergie libérée par l'hydrolyse n'est pas requise pour le raccourcissement et le développement de tension.

Au niveau de notre préparation, les résultats diffèrent selon la nature de l'anion d'accompagnement des cations. En ce qui concerne les effets des cations mono et divalents, la figure 38 révèle une bonne corrélation entre l'activité ATPasique et la contraction des myofilaments dans la mesure où le  $Cl^-$  est présent à une concentration normale dans la solution. Par contre, en absence de  $Cl^-$ , remplacé par du méthylsulfate, du sulfate ou du nitrate, aucune corrélation ne semble exister. En présence de  $Cl^-$ , la bonne corrélation se traduit par une droite dont l'équation est

$y = 15,2 + 30,2 x$  et dont le coefficient de régression est 0,86. Pour différentes équations de courbe testées (hyperbole, parabole...) le meilleur coefficient de corrélation est obtenu avec la relation  $y = ax + b$ .

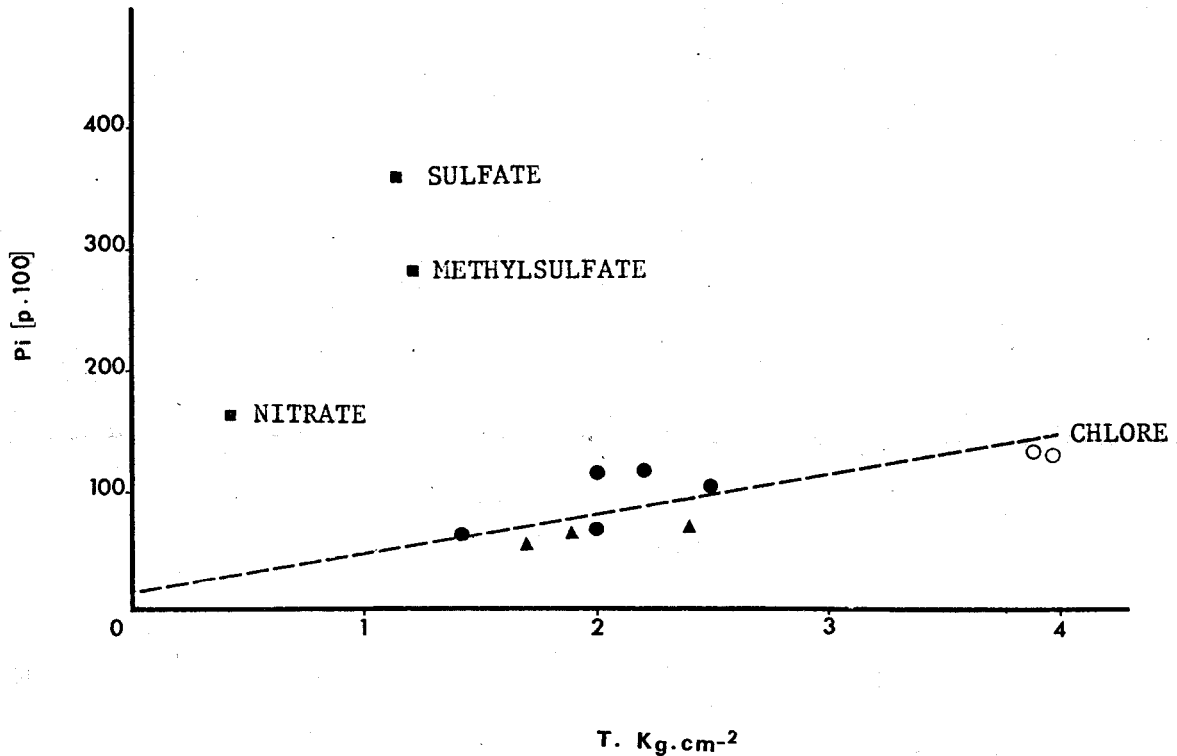


Figure 38

Relation entre l'activité ATPasique des protéines de structure et leur tension maximale de contraction pour des environnements ioniques variés.

La relation est établie pour les différents milieux de concentration variée en ions  $\text{Ca}^{++}$  (●) et en ions  $\text{Mg}^{++}$  (▲) en présence d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  ou en absence de l'un ou de l'autre (○). Cette relation est obtenue en présence d'ions  $\text{Cl}^-$  dans le milieu environnant. La meilleure relation est obtenue pour une équation de la forme  $y = ax + b$  avec un coefficient  $r = .86$  ( $y = 15,2 + 30,2 x$ ).

La substitution totale des ions  $\text{Cl}^-$  par d'autres anions conduit à un accroissement important de l'activité ATPasique et une forte réduction de la tension mécanique. Pour cette substitution totale des ions  $\text{Cl}^-$  seul un point est obtenu en nitrate, 1 en méthylsulfate et 1 en sulfate, pour des concentrations en  $\text{Ca}^{++}$  de 1 mM, en  $\text{Mg}^{++}$  de 7 mM, en  $\text{Na}^+$  de 62 mM et en  $\text{K}^+$  de 112 mM.

La figure 38 permet également de voir que la suppression totale du  $\text{Cl}^-$  de la solution et son remplacement par du méthylsulfate, du sulfate ou du nitrate modifie considérablement le rapport existant entre l'activité ATPasique et la contraction des myofilaments. De fait, si en présence de ces anions, utilisés comme substitut du  $\text{Cl}^-$ , l'activité ATPasique est considérablement augmentée, il s'en suit au contraire une diminution très importante de la tension maximale développée par ces myofilaments. Il est de plus possible, à partir de ces résultats, de constater que si le rapport entre la tension développée et l'activité ATPasique, donnant une idée du rendement, est calculé pour les différents milieux testés en présence de  $\text{Cl}^-$  (points situés sensiblement sur une droite), une valeur moyenne de  $2,7 \pm 0,6$  est trouvée ( $n = 10$ ) alors qu'en milieu nitrate ce rapport n'est que de 0,26, de 0,42 en milieu méthylsulfate et de 0,31 en milieu sulfate. Le nitrate, semble être de ce fait, le moins bon substitut du  $\text{Cl}^-$  pour l'obtention d'un bon transfert de l'énergie chimique en énergie mécanique. De ces résultats, il semble que l'accroissement d'énergie libérée en absence de  $\text{Cl}^-$  ne puisse être utilisé pour la contraction, ce qui pourrait peut être résulter d'un changement dans la conformation des molécules. De ce fait, le  $\text{Cl}^-$  pourrait être un maillon indispensable pour permettre un bon transfert de l'énergie chimique en énergie mécanique et être ainsi nécessaire pour permettre une bonne utilisation de l'énergie libérée par hydrolyse de l'ATP ; au niveau de la fibre isolée intacte, le  $\text{Cl}^-$  intracellulaire pouvant être un régulateur de la tension développée et de l'énergie libérée.

Toutefois, en plus de cette importance prépondérante et privilégiée des anions, il faut rappeler que les cations monovalents influencent directement la tension développée par les myofilaments. Ainsi, a notamment été vu le rôle capital joué par les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Ces ions interviennent, en effet, en tant que tels et non pas, en tant que quantité de cations monovalents, puisqu'ils ne peuvent être remplacés par le  $\text{Li}^+$  ou le  $\text{Rb}^+$  dans les milieux à force ionique équivalente. En effet, si le  $\text{Na}^+$  seul est ajouté aux ions divalents, une importante augmentation de la tension mécanique développée par les myofilaments est enregistrée, alors que cet "effet activateur" de l'ion  $\text{Na}^+$  est inhibé dès lors que cet ion est accompagné d'un autre cation monovalent, que ce soit le  $\text{Li}^+$ , le  $\text{Rb}^+$  ou le  $\text{K}^+$ . Par contre, si les ions  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Rb}^+$  sont ajoutés, séparément et seuls, aux cations diva-

lents, ils ne produisent aucune modification de l'amplitude de la tension mécanique. Les ions  $K^+$ , quant à eux, ajoutés seuls aux ions divalents, tout comme les ions  $Na^+$ , se sont révélés de parfaits "activateurs" du mécanisme contractile. Une tension de  $4 \text{ Kg.cm}^{-2}$  est enregistrée dans ces conditions alors qu'elle n'est que de l'ordre de  $2 \text{ Kg.cm}^{-2}$  en absence de  $Na^+$  et de  $K^+$ . D'autre part, un effet "antagoniste" de ces deux cations monovalents "activateurs" est relevé ; il suffit en effet d'accroître la concentration de  $K^+$  en présence d'une quantité fixe de  $Na^+$  pour voir la tension mécanique diminuer d'amplitude.

Enfin, bien évidemment, intervient, au niveau de la contraction des myofilaments, la concentration du milieu environnant en  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$  et ATP. C'est ainsi que le milieu permettant d'obtenir la meilleure activation du mécanisme myofibrillaire renferme 1 mM de  $Ca^{++}$ , 7 mM de  $Mg^{++}$  et 4 mM d'ATP. Il est satisfaisant de constater que c'est par ailleurs, sensiblement la composition du milieu qui permet la meilleure activité ATPasique (chapitre II).





CHAPITRE IV

CONTRACTURE POTASSIQUE ET POTENTIEL DE MEMBRANE

## I - INTRODUCTION

## II - TECHNIQUES

## III - RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Contracture de référence

### 2. Effets de l'environnement en ions divalents

2.1. Influence des ions  $Mg^{++}$

2.2. Influence des ions  $Ca^{++}$

2.3. Conclusion

### 3. Effets de l'absence de $Na^+$ . Importance sur les tensions mécaniques en milieu riche en $Ca^{++}$

3.1. Effets de l'absence de  $Na^+$  sur la relation :

$$\text{Tension} = f [K^+]_e$$

3.2. Influence de l'absence de  $Na^+$  sur la concentration optimale externe de  $Ca^{++}$  permettant l'activation maximale

3.3. Conclusion

### 4. Effets du TEA et de la variation de la concentration de $Cl^-$ sur la contracture potassique et la dépolarisation

4.1. Effets du TEA sur le couturier de grenouille

4.2. Effets du TEA sur la fibre musculaire de crabe à concentration extracellulaire en  $Cl^-$  normale

4.3. Effets du TEA sur la fibre musculaire de crabe à concentration extracellulaire en  $Cl^-$  réduite

4.4. Comparaison des effets du TEA sur la fibre musculaire de grenouille et sur celle de crabe. Conclusion.

### 5 - Influence de la concentration extracellulaire en $Cl^-$ sur la contracture potassique et le potentiel de membrane de la fibre isolée en présence de concentrations variées en ions $Na^+$ et $Ca^{++}$

5.1. Influence de la concentration extracellulaire en  $Cl^-$

5.2. Influence de l'ion  $Na^+$  en milieu pauvre en  $Cl^-$

5.3. Influence de l'absence de  $Ca^{++}$  en milieu pauvre en  $Cl^-$



- 5.4. Influence de la substitution du  $\text{Cl}^-$  par le  $\text{NO}_3^-$
- 5.5. Conclusion
- 6. Mise en évidence de deux composantes au courant entrant et analyse du décours de la contracture
  - 6.1. Existence de deux composantes en présence de  $\text{Na}^+$
  - 6.2. Evolution des composantes de la contracture et du potentiel de membrane en milieu  $\text{Li}^+$
  - 6.3. Evolution des deux composantes en milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{++}$
  - 6.4. Evolution des deux composantes en milieu  $\text{Sr}^{++}$
- 7. Conclusion sur le phénomène de contracture

## I - INTRODUCTION

Dans le muscle au repos, la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  intracellulaire est faible et est maintenue au-dessous d'un seuil permettant cet état de repos du muscle. La concentration sarcoplasmique est alors inférieure à  $10^{-7}$  M (voir entre autres la revue de GILLIS, 1977 ; celle de ENDO, 1977). Toute élévation de cette concentration sarcoplasmique de  $\text{Ca}^{++}$  au-dessus d'un certain seuil va permettre l'activation du mécanisme myofibrillaire et ainsi provoquer la contraction. Le  $\text{Ca}^{++}$ , en effet, comme cela vient d'être montré (chapitres précédents), intervient directement au niveau du couplage mécano-chimique. Dès lors, deux questions se posent :

1) Par quel mécanisme est-il possible d'obtenir un accroissement rapide de la concentration sarcoplasmique de  $\text{Ca}^{++}$  afin de provoquer la contraction d'une fibre musculaire ?

2) Comment ensuite la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  redevient-elle inférieure au seuil d'activation du mécanisme myofibrillaire ?

De nombreuses revues concernant le couplage excitation-contraction et l'importance du  $\text{Ca}^{++}$ , ont été publiées. Citons celles de CSAPO (1959), FRANK (1964), SANDOW (1965, 1970, 1973), REUBEN et coll. (1967), GAINER (1968), GILLIS (1975, 1977), COSTANTIN (1975), LUTTGAW et GRITSCH (1976), EBASHI (1976), ENDO (1977)... En fait, la dépolarisation de la membrane cellulaire à un niveau seuil est généralement considérée comme le phénomène initial dans le couplage excitation-contraction des fibres musculaires que ce soit pour la grenouille (KUFFLER, 1946 ; KATZ, 1950, WATANABE, 1958 ; ...), pour l'écrevisse (ORKAND, 1962 ; ZACHAR et ZACHAROVA, 1966 ; ...) ou pour la balane (HOYLE et SMYTH, 1963 ; EDWARDS et coll., 1964). Cette dépolarisation membranaire peut être provoquée sur les fibres isolées de diverses manières, notamment soit par passage à travers la membrane d'un courant, soit également par une élévation de la concentration du milieu externe en  $\text{K}^+$ . La dépolarisation de la membrane de surface est conduite à l'intérieur de la fibre via des invaginations de cette membrane qui constituent le système tubulaire transverse. Au niveau de ce dernier, chez la fibre musculaire de crabe, se trouvent, non seulement en profondeur, mais également très proche de la membrane externe, des zones dites de "couplage" qui constituent des contacts diadiques voir triadiques en profondeur entre les membranes de ce système tubulaire transverse et celles des citernes terminales du reticulum sarcoplasmique (R.S.) (DELORME et coll., 1978).

L'excitation de ce R.S., consécutive à la dépolarisation, va permettre la libération du  $\text{Ca}^{++}$  contenu dans ces citernes. Ces dernières constituent en fait des réservoirs où se trouve stocké le  $\text{Ca}^{++}$  lors du repos. L'augmentation rapide de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  au contact des myofibrilles, due à la libération du  $\text{Ca}^{++}$  des citernes du R.S., va ainsi permettre le développement du phénomène mécanique. C'est le captage de cet ion par le même R.S. qui va entraîner la relaxation (SANDOW, 1965 ; EBASHI et ENDO, 1968 ; ENDO, 1977). Cette libération et accumulation du  $\text{Ca}^{++}$  par des vésicules isolées de R.S. peuvent cependant être affectées par divers facteurs, notamment anions et pH de la solution (SORENSEN et DE MEIS, 1977).

Le mécanisme d'accumulation du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. est montré être essentiellement un transport actif dépendant de l'ATP (HASSELBACH, 1964, 1966 ; EBASHI et ENDO, 1968). D'autre part, ENDO et KITAZAWA (1976) montrent que l'ATP affecte également le processus de libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S., bien qu'à la fois la dépolarisation et la caféine peuvent induire la libération de  $\text{Ca}^{++}$  en absence d'ATP, ce qui est distinct de l'accumulation active de  $\text{Ca}^{++}$  par ce R.S. Toutefois, l'étroite dépendance de la libération de  $\text{Ca}^{++}$  induite par le  $\text{Ca}^{++}$  (" $\text{Ca}^{++}$ -induced  $\text{Ca}^{++}$  release") et l'ATP peut suggérer que le mécanisme de libération peut avoir des relations avec un mécanisme de pompe à  $\text{Ca}^{++}$ . L'ion  $\text{Ca}^{++}$  lui même, est en effet, montré être apte à induire la libération du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. de fibres pelées (FORD et PODOLSKY, 1968, 1972 a et b). Cette libération induite par l'ion  $\text{Ca}^{++}$  lui-même est profondément affectée par le  $\text{Mg}^{++}$  libre (ENDO, 1975). Cette libération du  $\text{Ca}^{++}$  peut venir du fait que la dépolarisation de surface, puis celle du système T, provoque une faible entrée de  $\text{Ca}^{++}$  à l'intérieur du sarcoplasme, qui est trop faible, dans les conditions normales, pour activer elle-même le système contractile mais qui agirait sur le R.S. pour induire la libération du  $\text{Ca}^{++}$  des citernes : " $\text{Ca}^{++}$ -induced release of  $\text{Ca}^{++}$ " (BIANCHI, 1968 ; ENDO et coll., 1970 ; MILLER, 1974 ; FABIATO et FABIATO, 1975 a et b). Cependant, un autre type de libération peut être envisagé, à savoir que la dépolarisation du système T induit une modification du R.S. qui, augmentant la perméabilité au  $\text{Ca}^{++}$ , agit comme un "trigger" et aboutit à la libération du  $\text{Ca}^{++}$  : "depolarization induced release of  $\text{Ca}^{++}$ " (COSTANTIN et PODOLSKY, 1967 ; NAKAJIMA et ENDO, 1973 ; THORENS et ENDO, 1975). Ces derniers auteurs, travaillant sur la fibre musculaire de Xenopus, trouvent que ces deux précurseurs de la libération de  $\text{Ca}^{++}$  sont indépendants et que l'hypothèse faisant de l'ion  $\text{Ca}^{++}$  le premier médiateur du système T au R.S. pour induire la libération de  $\text{Ca}^{++}$  est moins



vraisemblable. Précisons que d'autres processus peuvent intervenir dans le cadre de la libération du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S., notamment par exemple sous l'effet du pH, de la caféine... (voir revue de ENDO, 1977). De plus, il est nécessaire de préciser que ces processus de libération du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. diffèrent selon les préparations étudiées. C'est ainsi que FABIATO et FABIATO (1977) concluent que, dans le muscle cardiaque de mammifères, le  $\text{Ca}^{++}$  qui traverse la membrane durant le potentiel d'action peut initier la libération du  $\text{Ca}^{++}$  du R.S., alors que dans le muscle squelettique rapide, cette libération peut être induite par la dépolarisation du tubule transverse à travers un processus qui ne nécessite pas le  $\text{Ca}^{++}$ . Pour les autres types de muscle, muscles lents squelettiques ou muscles lisses, il y aurait des combinaisons de ces deux processus. En fait, l'apposition des membranes entre le tubule et la citerne du R.S., au niveau de la fibre de crabe, formant des diades ou des triades, constitue une zone que nous avons appelée "jonction de couplage" (DELORME et coll., 1978) qui est en fait un maillon important dans le couplage excitation-contraction. En effet, une simple modification, au niveau de cette "jonction", suffit à supprimer le phénomène mécanique sans pour autant altérer le phénomène électrique qui est le potentiel d'action. L'existence de "trabécules" à ce niveau pourrait faire penser à une liaison directe. Cependant, sur d'autres préparations (fibres musculaires de grenouille et de poissons), FRANZINI-ARMSTRONG (1975), en utilisant la technique du cryodécapage, ne montre pas l'existence de canaux préformés entre ce R.S. et la lumière du tubule T et suggère de ce fait que le couplage direct entre ces deux membranes durant l'excitation est peu probable. Cependant, la transmission du signal activateur au reticulum pourrait être assurée par des modifications de la position de molécules sous l'effet de la dépolarisation, transmise au long des tubules, qui contrôle de ce fait la libération de  $\text{Ca}^{++}$  (voir GILLIS, 1977 ; ENDO, 1977). Faisant suite à cette libération du  $\text{Ca}^{++}$  par les citernes du R.S., la contraction des myofilaments se produit, et le relâchement se manifeste grâce à la reprise du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S., à des endroits cependant différents des citernes du R.S., sans toutefois oublier l'intervention des mitochondries. Le  $\text{Ca}^{++}$  ne se retrouve en fait au niveau des citernes que quelques instants après. Toutefois, il semble que le R.S. ne puisse accumuler à vitesse suffisamment grande tout le  $\text{Ca}^{++}$  pour expliquer le relâchement rapide et il peut être postulé de ce fait l'existence de molécules à haute affinité pour le  $\text{Ca}^{++}$  qui dissocieraient le complexe Ca-TN.C et qui permettraient

une reprise plus lente du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. (voir GILLIS, 1977 ; ENDO, 1977).

Ainsi donc, la dépolarisation membranaire de surface qui est à l'origine de la libération du  $\text{Ca}^{++}$  constitue la 1ère étape du couplage excitation-contraction qui est appelée par certains auteurs couplage électrocalcique. Cependant, les relations entre activité électrique et activité mécanique sont difficiles à entrevoir lors d'une dépolarisation brève du type potentiel d'action. Aussi, l'étude en est plus aisée lors de l'enregistrement de contractures pour lesquelles il est possible d'avoir un effet graduel de la dépolarisation comme le notait SANDOW dès 1965. Ces dépolarisations sont consécutives, dans le cas de notre étude, à l'application au niveau de la fibre de crabe, du milieu de référence enrichi en ions  $\text{K}^+$ . Dans de telles circonstances, après avoir vu l'influence importante, aussi bien au niveau de l'activité ATPasique qu'au niveau direct des myofilaments, des cations divalents ou monovalents ainsi que des anions, il est nécessaire de voir leurs effets au niveau d'une préparation intacte, ayant conservé toute son organisation ultrastructurale, du sarcolemme au R.S. Ainsi, il sera peut-être possible de faire la part de ce qui revient à l'action des ions au niveau membranaire, connaissant leur rôle respectif au niveau du couplage mécano-chimique qui constitue la 2ème phase du couplage excitation-contraction. Auparavant, de même qu'il était nécessaire, lors de l'étude de l'activité ATPasique et de la contraction des myofilaments isolés, de maintenir parfaitement le pH des solutions utilisées, il importe dans le cas de l'étude des contractures, de bien ajuster le pH des diverses solutions employées à des valeurs stables. En effet, la participation de la concentration en ions  $\text{H}^+$  est bien connue dans le couplage excitation-contraction (SANDOW, 1970 ; WADA et GOTO, 1975 ; ENDO, 1977 ; ... voir chapitre II) ; le processus de libération de  $\text{Ca}^{++}$  du R.S. est, en particulier, dépendant du pH (NAKAMARU et SCHWARTZ, 1972). De même, sur la fibre de crabe, HUDDART (1971) indique que lors de contracture induite par la quinine, le lieu d'action des ions  $\text{H}^+$  se trouve être les tubules transverses et, la modification du pH peut entraîner une mobilisation différente du  $\text{Ca}^{++}$ .



## II - TECHNIQUES

La fibre est prélevée, comme indiqué au chapitre I, et est placée dans une cuve tout comme pour l'étude de la contraction des myofilaments (Fig. 20). Cette fibre est amenée, comme précédemment, à sa longueur d'équilibre  $l_0$  puis est étirée de 25 p. 100 à partir de cette longueur. L'enregistrement de la tension se fait à 20° C avec le même transducteur que celui utilisé précédemment (chapitre III) et la force développée par ces fibres est exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ .

Pour une bonne partie des résultats, concernant la contracture et qui seront présentés dans ce chapitre, parallèlement à l'enregistrement du phénomène mécanique, le phénomène électrique est enregistré. Initialement, une microélectrode remplie de KCl 3 M est implantée, sous contrôle binoculaire, à l'aide d'un micromanipulateur Prior, dans la fibre et permet l'enregistrement du potentiel de membrane de cette fibre par rapport à une électrode indifférente impolarisable placée dans la solution physiologique. Seules sont conservées les microélectrodes qui ont une impédance comprise entre 5 et 10  $\text{M}\Omega$  et un potentiel de pointe inférieur à 4 mV. L'électrode indifférente est constituée par un pont de KCl 3 M gélosé baignant donc d'un côté dans le liquide physiologique et de l'autre dans un réservoir de KCl 3 M relié à un changeur d'impédance par l'intermédiaire d'un fil d'argent chloruré. La borne d'entrée du changeur d'impédance est, quant à elle, reliée à la microélectrode, remplie de KCl, par un fil d'argent chloruré. L'enregistrement du potentiel de membrane et sa variation (dépolariation) consécutive à l'application d'un milieu hyperpotassique se fait sur l'une des voies de l'enregistreur à plumes Allco, type EN 28, alors que l'enregistrement du phénomène mécanique se fait sur l'autre voie.

Les solutions sont rendues hyperpotassiques par apport convenable de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , la concentration en  $\text{Cl}^-$  du milieu de référence est de ce fait maintenue constante. Précisons de suite que ceci entraîne bien évidemment un accroissement de la pression osmotique ; la concentration osmolaire passe de 1163 mosm dans le milieu de référence à 1530 mosm lorsque la concentration en  $\text{K}^+$  est multipliée par 20. Toutefois cette faible augmentation de pression osmotique n'entraîne aucun effet sur la tension développée puisqu'en conservant l'isotonie par remplacement d'une partie du NaCl

(245 mM) de la solution de référence par du KCl la même amplitude de contracture est obtenue. Parallèlement, la force ionique du milieu est légèrement modifiée de même que l'activité du  $\text{Ca}^{++}$  qui passe de  $2,83 \cdot 10^{-3}$  à  $2,52 \cdot 10^{-3}$  lorsque la concentration normale de  $\text{K}^+$ , 12,9 mM, passe à 258 mM (20 fois  $[\text{K}^+]_e$ ).

### III - RESULTATS ET DISCUSSION

Les contractures enregistrées ici sont donc consécutives à l'application d'un milieu dépolarisant hyperpotassique. Cependant, ainsi que cela sera constaté ultérieurement, lors de l'étude des effets de milieux anormaux, l'application de certains milieux de concentration normale en  $\text{K}^+$  est capable d'induire une contracture, notamment ceux dépourvus de  $\text{Cl}^-$ . Un tel type de contracture a par ailleurs déjà été décrit dans la littérature, en particulier sur une fibre musculaire d'un crustacé, le homard, par GAINER en 1968. Toutefois, le milieu hyperpotassique comme milieu dépolarisant est très employé et de nombreux travaux font référence à de tels types de contracture, et pour ne citer que ceux concernant les fibres musculaires de crustacés, rappelons les travaux de ATWOOD, 1963 ; ZACHAR et ZACHAROVA, 1966 ; REUBEN et coll., 1967 ; MATSUMURA, 1968). Selon la préparation étudiée, différents types de réponses, à l'excès de  $\text{K}^+$  externe, peuvent être enregistrés. Dans un cas, la tension mécanique développée est maintenue sensiblement au même niveau tant que la dépolarisation est maintenue. Il s'agit alors de fibres dites "toniques". Par contre, si consécutivement à l'application de l'excès de  $\text{K}^+$ , la tension mécanique se développe, passe par un maximum puis chute, bien que la dépolarisation soit maintenue, les fibres sont dites "phasiques". Ces deux types de réponses toniques et phasiques ont par ailleurs été décrits, au niveau du muscle fléchisseur de crabe, par DORAI RAJ (1964) et ATWOOD et DORAI RAJ (1964). Précisons, dès à présent, qu'en ce qui concerne notre étude, les fibres sont toujours prélevées dans la même région proximale du méropodite de la patte locomotrice et les enregistrements correspondent à des contractures de type "phasique".

#### 1 - Contractures de référence

La tension mécanique se développe consécutivement à l'application

du milieu hyperpotassique. La figure 39 montre la relation liant l'amplitude de la contracture à la concentration du milieu extracellulaire en  $K^+$ . L'allure de la courbe est sigmoïde et est, de ce fait, semblable à celle obtenue sur la fibre musculaire d'écrevisse par ZACHAR et ZACHAROVA (1966), d'insecte par HOYLE (1961) ou encore de grenouille par HODGKIN et HOROWICZ (1960 a). Le seuil d'activation du mécanisme contractile est atteint pour une concentration en  $K^+$  de 129 mM et l'activation maximale survient lorsque cette concentration de  $K^+$  est de 258 mM. En effet, des concentrations supérieures (jusque 30 fois la normale) ne provoquent aucune augmentation de la

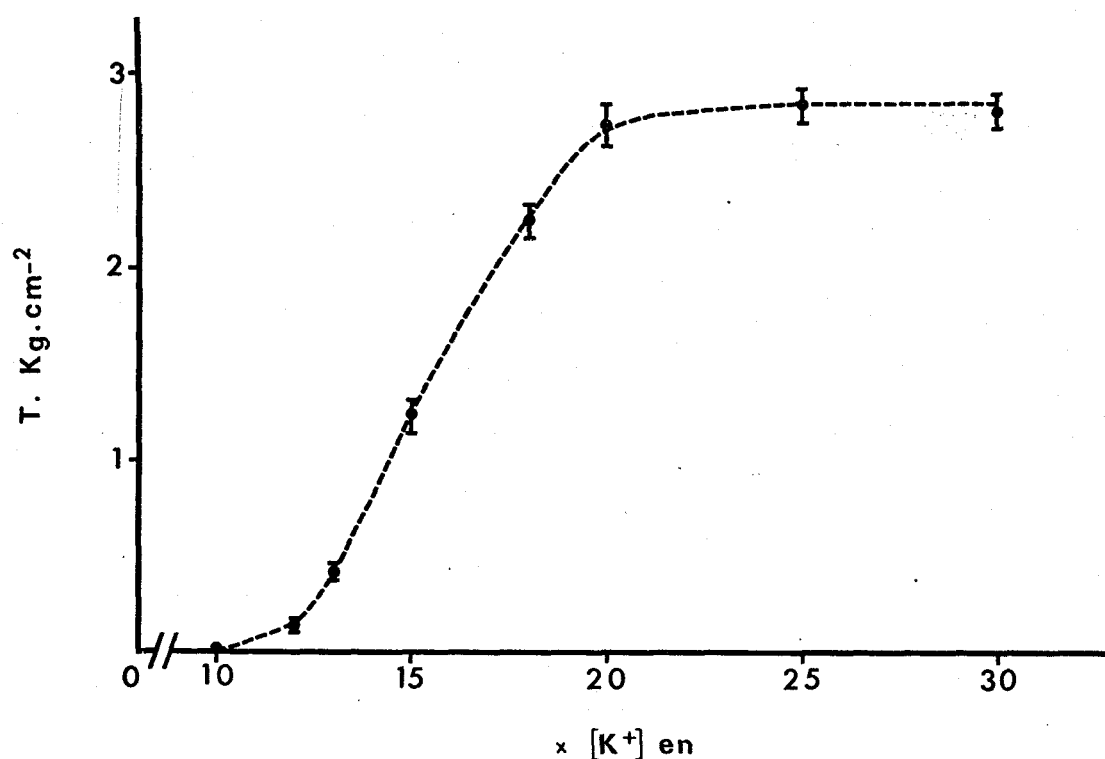


Figure 39

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures, exprimée en Kg-cm<sup>-2</sup>, en fonction de la concentration extracellulaire en  $K^+$ .

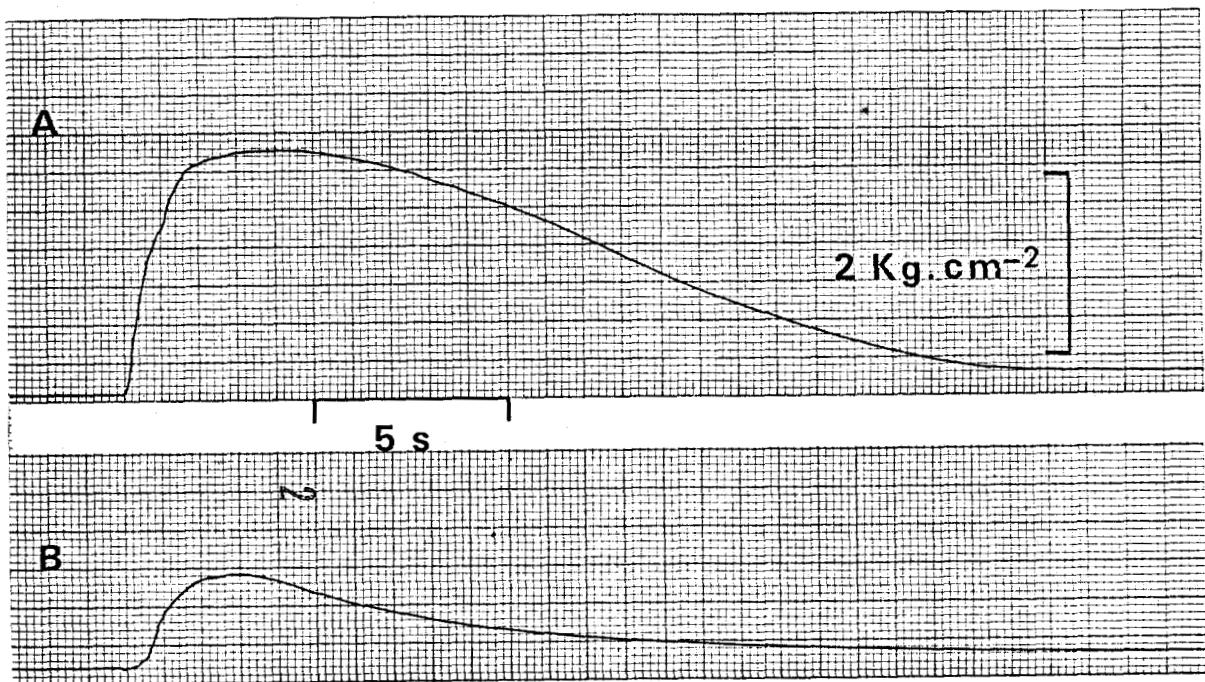
La concentration extracellulaire normale (en) en ions est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Cl^- = 596,7$  mM ;  $CO_3 H^- = 2,6$  mM. La variation de la concentration en  $K^+$  est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en  $SO_4^{--}$  (apport de  $K_2SO_4$ ).

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 9$ )

Courbe publiée aux C. R. Acad. Sc., Paris, 275, 1649-1652 par BRULE et coll. (1972).

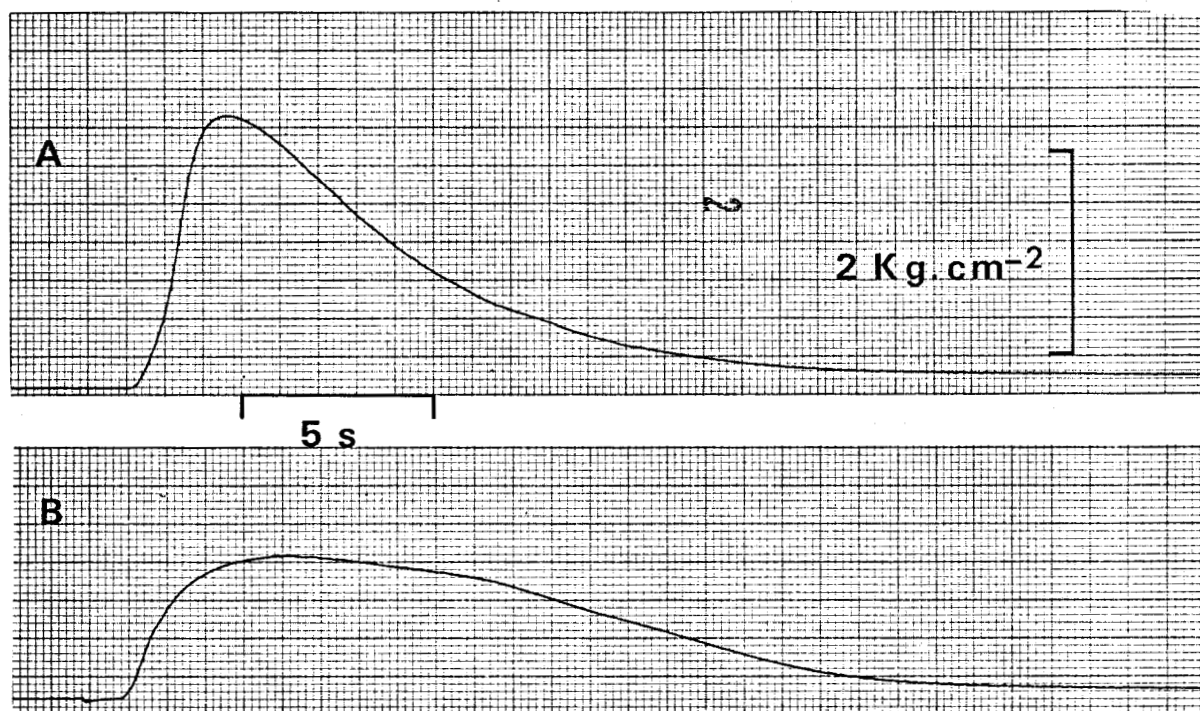
tension développée mais juste un maintien à la valeur maximale qui est en moyenne de  $2,70 \text{ Kg.cm}^{-2}$  (rappelons que l'activité du  $\text{Ca}^{++}$  pour ces différentes solutions n'est quasiment pas modifiée.

Toutefois, il est extrêmement difficile d'obtenir deux contractions sur la même fibre à moins de séparer les deux épreuves par un temps très long (de l'ordre d'une heure). En effet, comme l'attestent les enregistrements ci-après, si la deuxième contraction est produite après un laps de temps plus court, son amplitude est nettement inférieure à la première et son décours différent. Certaines contractions témoin, dans de rares cas, peuvent cependant avoir un décours plus rapide que la moyenne comme le montre l'un des deux exemples présentés.



Exemple 1 : A. Contracture témoin ( $\text{K}^+ = 258 \text{ mM}$ )

B. Contracture après 20 minutes de retour en milieu de référence.



Exemple 2 : A. Contracture témoin ( $K^+ = 258 \text{ mM}$ )

B. Contracture après 35 minutes de retour en milieu de référence.

De ce fait une analyse statistique des résultats à partir de moyennes encadrées de leur écart type a-t-elle été rendue nécessaire. La tension moyenne correspondant à la contracture de référence (20 fois  $K^+ e$ ) est de  $2,70 \pm 0,10 \text{ Kg.cm}^{-2}$ , le maximum étant obtenu après  $3,9 \pm 0,3 \text{ s}$ . Quant à la phase de relaxation, sa durée est en moyenne de  $20,6 \pm 2,1 \text{ s}$  ( $n = 10$ ). L'extrême difficulté d'obtenir une deuxième contracture après un temps relativement court (10 mn) peut, semble-t-il, s'expliquer si l'on tient compte du retour extrêmement lent du potentiel de repos à sa valeur de référence après la dépolarisation de la fibre par le milieu riche en  $K^+$  (MOUNIER, 1970 ; GOUBEL, 1973 ; nos résultats).

L'amplitude du phénomène mécanique dépend de la concentration de  $K^+$  par l'intermédiaire de la dépolarisation membranaire. Celle-ci, comme l'indique la figure 40, varie linéairement avec le logarithme de la concentration externe de  $K^+$ . Cette courbe, tracée à partir des valeurs mesurées du potentiel atteint lors de l'application du milieu enrichi de 10 à 20 fois (129 à 258 mM de  $K^+$ ), coïncide avec celle tracée sur la même préparation,

par GOUBEL (1973) pour des valeurs comprises entre 12,9 et 129 mM de  $K^+$  (points évidés). La dépolarisation est donc d'autant plus importante que la concentration externe de  $K^+$  est elle-même accrue, la pente de la droite étant de 38 mV pour une variation de 10 fois la concentration externe.

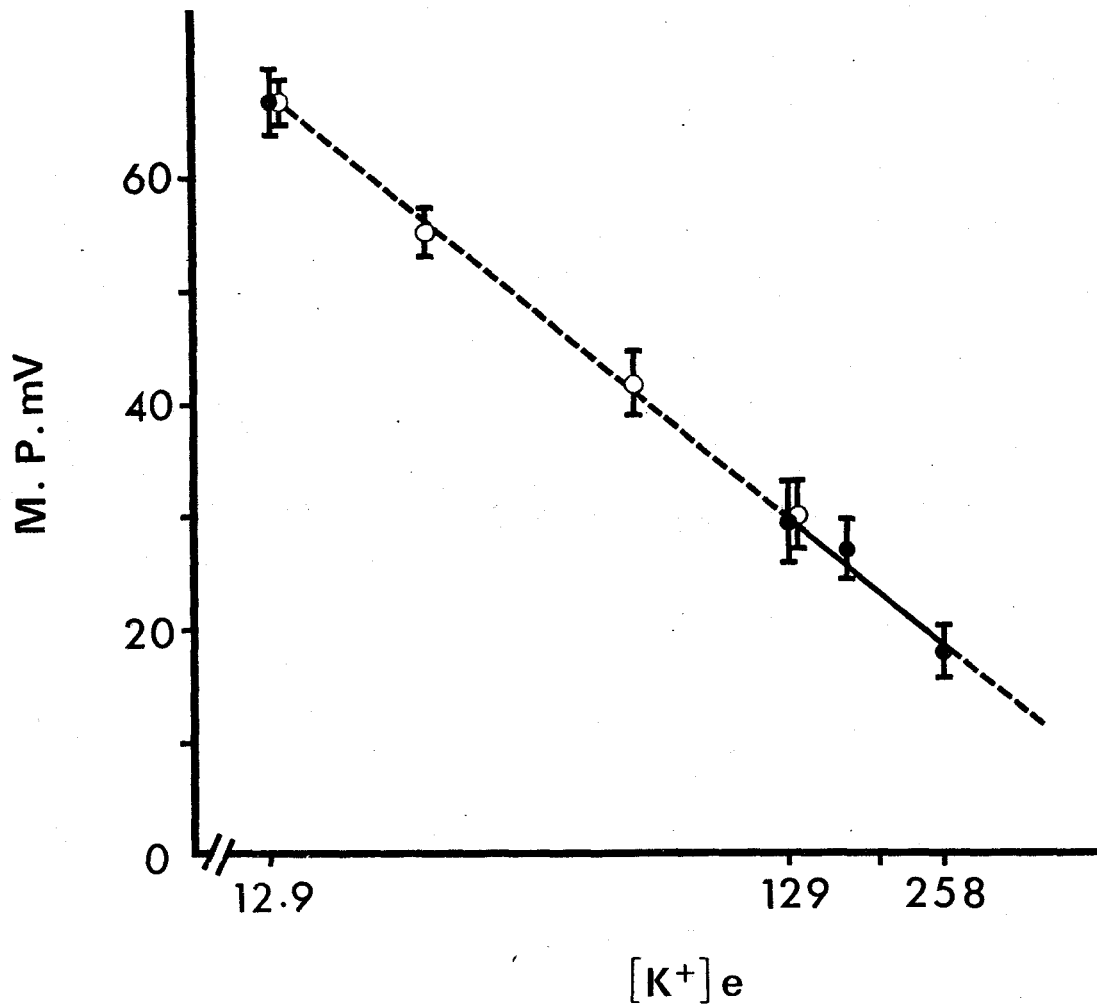


Figure 40

Evolution du potentiel de membrane (MP) en valeur absolue, exprimé en mV, en fonction du logarithme de la concentration extracellulaire de  $K^+$ , exprimée en mM.

Les points représentés (O) correspondent à ceux obtenus, sur la même préparation, par GOUBEL (1973). Les points (●) correspondent à nos mesures.

La concentration extracellulaire normale en ions est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Cl^- = 596,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. La variation de la concentration en  $K^+$  est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en  $SO_4^{--}$  (apport de  $K_2SO_4$ ).

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 10$ ).

La relation entre le potentiel de membrane et l'évolution de la tension a été étudiée par HODGKIN et HOROWICZ (1960 a) sur des fibres isolées de grenouille par changement rapide de la concentration externe en  $K^+$ . De même, au niveau de notre préparation, la possibilité de tracer la courbe relatant l'évolution de la tension mécanique en fonction de la valeur du potentiel de membrane (Fig. 41) permet de constater que l'activation du mécanisme contractile survient pour une valeur de potentiel de membrane de  $-30$  mV et qu'elle est maximale dès l'instant où la valeur de ce potentiel atteint  $-18$  mV en moyenne. La relation a l'allure générale d'une sigmoïde. Toutefois, le seuil de  $-30$  mV apparaît élevé par rapport à ceux trouvés sur d'autres préparations, notamment sur la fibre d'écrevisse où ZACHAR et ZACHAROVA (1966) donnent un seuil d'activation de  $-55$  mV, de même valeur que celui observé par HODGKIN et HOROWICZ (1960 a) sur la fibre de grenouille. Ces variations pourraient être liées à la vitesse de la dépolarisation consécutive à l'application du milieu enrichi en ions  $K^+$ . En effet, la vitesse de la dépolarisation intervient sur le développement de la contracture. C'est ainsi qu'un seuil de  $-40$  mV peut être atteint comme cela sera montré ultérieurement : dans le cas où la vitesse de la phase de dépolarisation est plus rapide (milieu TEA). De même, sur le diaphragme de rat, LÜLLMAN et REIS (1967) montrent qu'un enrichissement progressif du milieu extracellulaire en  $K^+$ , permet d'atteindre la valeur du potentiel de membrane correspondant, dans les conditions normales, à l'activation maximale du mécanisme contractile sans pour autant déclencher la contracture. En ce qui concerne l'activation maximale, les valeurs de potentiel trouvées sur la fibre d'écrevisse et sur la fibre de grenouille sont sensiblement voisines de celle trouvée sur notre préparation puisqu'elles sont respectivement de  $-20$  et  $-25$  mV. Au niveau de notre préparation, du fait du seuil d'activation élevé, le mécanisme contractile apparaît s'activer et se développer pleinement dans une zone relativement restreinte de potentiel. Le potentiel d'action (P A), consécutif à une dépolarisation induite par l'application d'un courant électrique, dans les conditions normales, atteignant au maximum une valeur de potentiel de  $-10$  mV (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a), pourrait donc permettre, sous certaines conditions, une activation maximale du mécanisme contractile. Cependant, l'amplitude de la secousse résultante dépend en général de la durée du phénomène électrique que représente ce PA. De ce fait, l'étude des effets de la variation du potentiel de membrane sur le mécanisme contractile sem-



ble plus aisée à aborder par l'intermédiaire de la contracture. Les conditions de contracture <sup>de référence</sup> étant déterminées, la concentration en  $K^+$  externe qui sera utilisée pour la suite des expériences sera, le plus souvent, celle qui permet l'activation maximale, soit 258 mM.

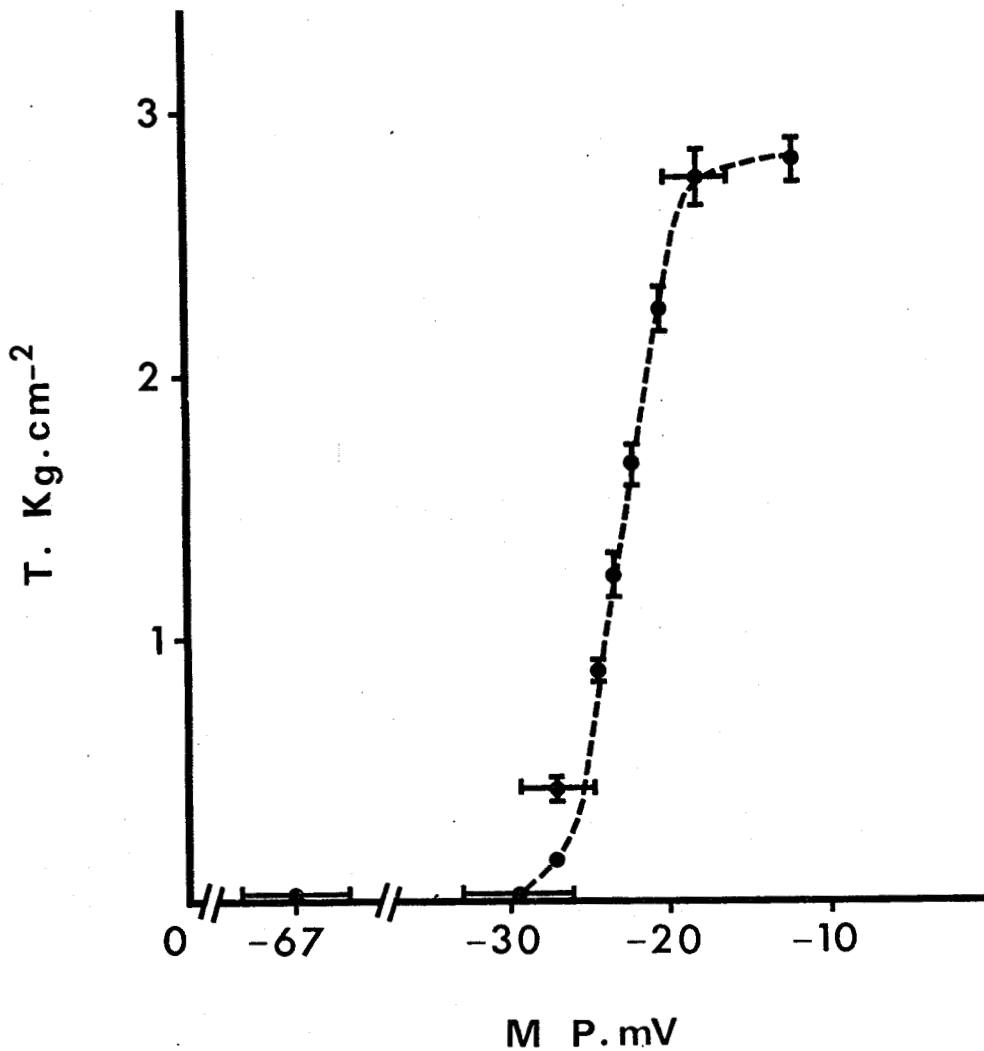


Figure 41

Relation liant la tension mécanique maximale de contracture (T), exprimée en Kg.cm<sup>-2</sup>, au potentiel de membrane (MP), exprimé en mV.

Chaque point de la courbe représente une valeur moyenne ( $m$ ) encadrée horizontalement de l'écart-type correspondant au potentiel de membrane ( $n = 10$ ) et verticalement de l'écart-type correspondant à la tension mécanique maximale ( $n = 9$ ).

De la même façon que pour l'étude de la contraction des myofilaments, sera abordée, au niveau de la fibre intacte, l'importance de l'environnement ionique ; ceci permettra, connaissant le rôle des ions sur les myofilaments, de tenter d'interpréter les phénomènes se situant au niveau membranaire.

## 2 - Effets de l'environnement en ions divalents

Au niveau des fibres musculaires d'invertébrés et en particulier de crustacés, il existe un P A de nature essentiellement calcique. L'analyse des courants membranaires permet en effet de montrer que la nature du courant lors de l'activité est essentiellement calcique (HAGIWARA et NAKA, 1964 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a ; KEYNES et coll., 1973 ; HAGIWARA et coll., 1974 ; HAUDECOEUR, 1975 ; BRULE et coll., 1977 a). L'entrée de  $Ca^{++}$  est consécutive à une augmentation de la conductance calcique de la membrane sous l'influence de la dépolarisation membranaire. Cet accroissement de conductance membranaire au  $Ca^{++}$  est une étape essentielle dans le couplage excitation-contraction du muscle squelettique de crustacé (GIRARDIER et coll., 1963 ; REUBEN et coll., 1967) alors que GAINER (1968) montre, sur la fibre de homard, que la contracture potassique produit un influx de  $Ca^{++}$  extracellulaire qui peut directement activer le mécanisme contractile. De même, cet influx de  $Ca^{++}$  durant l'activité est observé sur la fibre de grenouille par BIANCHI et SHANES (1959), CURTIS (1966), et confirmé par BEATY et STEFANI (1976 a et b). D'autre part, le maintien préalable du muscle de homard, dans une solution saline pauvre en  $Ca^{++}$  (0,1 mM) élimine complètement la contracture produite normalement par l'accroissement de la concentration en  $K^+$  (GAINER, 1968). De même, au niveau du myocarde, la perfusion par un milieu sans  $Ca^{++}$  provoque un découplage excitation-contraction et, la durée de la perfusion par le milieu dépourvu de  $Ca^{++}$  a une importance déterminante sur la réponse myocardique consécutive à la réintroduction de  $Ca^{++}$  dans le milieu de perfusion (PARADISSE et VISSCHER, 1975). Sur la fibre squelettique de grenouille, CHIARANDINI et STEFANI (1973) montrent également que le  $Mn^{++}$ , connu pour bloquer la perméabilité membranaire au  $Ca^{++}$ , réduit la contracture potassique. L'entrée de  $Ca^{++}$  peut être associée à certains processus intermédiaires entre la dépolarisation membranaire et la contraction musculaire (BIANCHI, 1961). De même, sur la fibre musculaire d'écrevisse, ZACHAROVA

et ZACHAR (1967) montrent que la tension de contracture potassique est directement reliée à la concentration du  $\text{Ca}^{++}$  externe. Une relation sigmoïde est décrite par CHAPMAN et TUNSTALL (1970) pour les trabécules auriculaires de grenouille. La concentration de  $\text{Ca}^{++}$  externe influence directement la relation liant la tension à la concentration du  $\text{K}^+$  extracellulaire, et, un accroissement de la concentration externe en  $\text{Ca}^{++}$  provoque un déplacement de la courbe dans le sens des dépolarisations. De même, sur la grenouille, CAPUTO et GIMENEZ (1967) observent un seuil de contracture pour une concentration de  $\text{K}^+$  de 20 mM en absence de  $\text{Ca}^{++}$  et de 35 mM en présence de 1,8 mM de  $\text{Ca}^{++}$ . LÜTTGAU (1963) trouve le même seuil en présence de 1,8 mM de  $\text{Ca}^{++}$  et un seuil de 75 mM de  $\text{K}^+$  en présence de 5 mM de  $\text{Ca}^{++}$ . De même, ETZENSPENGER (1970) montre sur le couturier de grenouille que l'enrichissement en  $\text{Ca}^{++}$  provoque un déplacement similaire des courbes reliant la tension à la concentration en  $\text{K}^+$  du milieu. Cet auteur a tracé 3 courbes correspondant à des concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  de 0,5 ; 1,8 ; 10 mM et, observe que la faible hyperpolarisation relevée pour les milieux riches en  $\text{Ca}^{++}$  ne peut expliquer cette variation de seuil. Cet auteur montre de même que, pour une concentration en  $\text{K}^+$  identique (40 mM), la tension maximale de contracture dépend du  $\text{Ca}^{++}$  externe ; elle est reliée au logarithme de cette concentration de  $\text{Ca}^{++}$  par une courbe en cloche présentant un optimum pour 0,5 mM de  $\text{Ca}^{++}$ .

Bien que l'influence prépondérante du  $\text{Ca}^{++}$  soit ainsi mise en évidence au niveau du développement du phénomène mécanique sur la fibre intacte, il y a lieu également de tenir compte qu'un autre ion divalent, en l'occurrence le  $\text{Mg}^{++}$ , présent dans la solution physiologique normale, peut intervenir. En effet, s'il est connu que la concentration externe de  $\text{Mg}^{++}$  n'influence pas le potentiel de repos des fibres musculaires de crustacés (FATT et KATZ, 1953 ; HAUDECOEUR, 1971), il n'en est pas de même en ce qui concerne l'activité électrique. De fait, l'abaissement de la concentration extracellulaire en  $\text{Mg}^{++}$  provoque une augmentation de la vitesse de dépolarisation lors du potentiel d'action (HAUDECOEUR et coll., 1972 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 b). Au niveau de la contracture potassique, LÜTTGAU (1963) montre qu'avec 1,8 mM de  $\text{Ca}^{++}$  et 60 mM de  $\text{K}^+$ , par exemple, la fibre développe une tension de 100 mg environ, mais, que l'addition de  $\text{Mg}^{++}$  (4,2 mM) aux solutions (d'équilibre et de contracture) provoque une chute de la tension. Cette chute peut être comprise dans la mesure où le

$Mg^{++}$  inhibe la conductance de la membrane au  $Ca^{++}$ . Parallèlement, l'addition de  $Mg^{++}$  aboutit à une augmentation de la durée du plateau de contraction. Pour cet auteur, le  $Mg^{++}$  agirait selon une voie similaire au  $Ca^{++}$ , mais de façon moins effective. De même, KOVACS et O'DONNEL (1973), O'DONNEL et KOVACS (1974) observent, sur le couturier de grenouille, qu'après un prétraitement en solution riche en  $Mg^{++}$ , la tension de contracture potassique est diminuée alors que la relaxation de cette contracture est significativement ralentie. Ces auteurs montrent de plus que l'inhibition de la contraction du muscle dans un milieu enrichi en  $Mg^{++}$  est accompagnée d'une réduction de l'échange de  $Ca^{++}$  au repos dans un ou plusieurs compartiments intracellulaires. Signalons toutefois que STEPHENSON et PODOLSKY (1977 a) utilisant des fibres pelées, indiquent que la prise active du  $Ca^{++}$  par le reticulum sarcoplasmique in situ est stimulée par le  $Mg^{++}$ , ce qui en tout état de cause devrait conduire à une relaxation plus rapide.

### 2.1. Influence des ions $Mg^{++}$

Pour étudier les effets de ces ions au niveau de la fibre musculaire squelettique de crabe, cette fibre est baignée pendant 10 mn (temps permettant l'effet maximal) dans les milieux de concentration variée en  $Mg^{++}$  avant d'être soumise à l'action du même milieu mais enrichi 20 fois en  $K^+$ . Les figures 42 et 43 montrent les effets de ces ions. La figure 42 est relative aux milieux appauvris en  $Mg^{++}$ . De fait, la tension développée par la fibre est d'autant plus faible que la concentration en  $Mg^{++}$  est réduite, toutefois l'absence totale de  $Mg^{++}$  permet le développement d'une contracture non négligeable (1,85 Kg.cm<sup>-2</sup>). Si la réduction de la concentration en  $Mg^{++}$  du milieu externe entraîne une chute de la tension de contracture, il en est de même en ce qui concerne un enrichissement extracellulaire en  $Mg^{++}$  ainsi que l'atteste la figure 43; l'apport de  $Mg^{++}$  est réalisé sous forme de sulfate dans le but de maintenir constante la concentration en chlore. La tension de contracture est quasiment annulée lorsque la concentration de  $Mg^{++}$  est multipliée par 4. L'activité du  $Ca^{++}$  pour l'ensemble de ces solutions ne varie quasiment pas (effet éventuel de la force ionique). La tension est donc maximale pour un milieu contenant le  $Mg^{++}$  à sa concentration de référence soit 23,6 mM. Le  $Mg^{++}$

influence l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  et, de ce fait, les milieux riches en  $\text{Mg}^{++}$  provoquent une diminution de l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  qui peut plaider en faveur de la diminution de la tension enregistrée. Ainsi donc, l'importance du

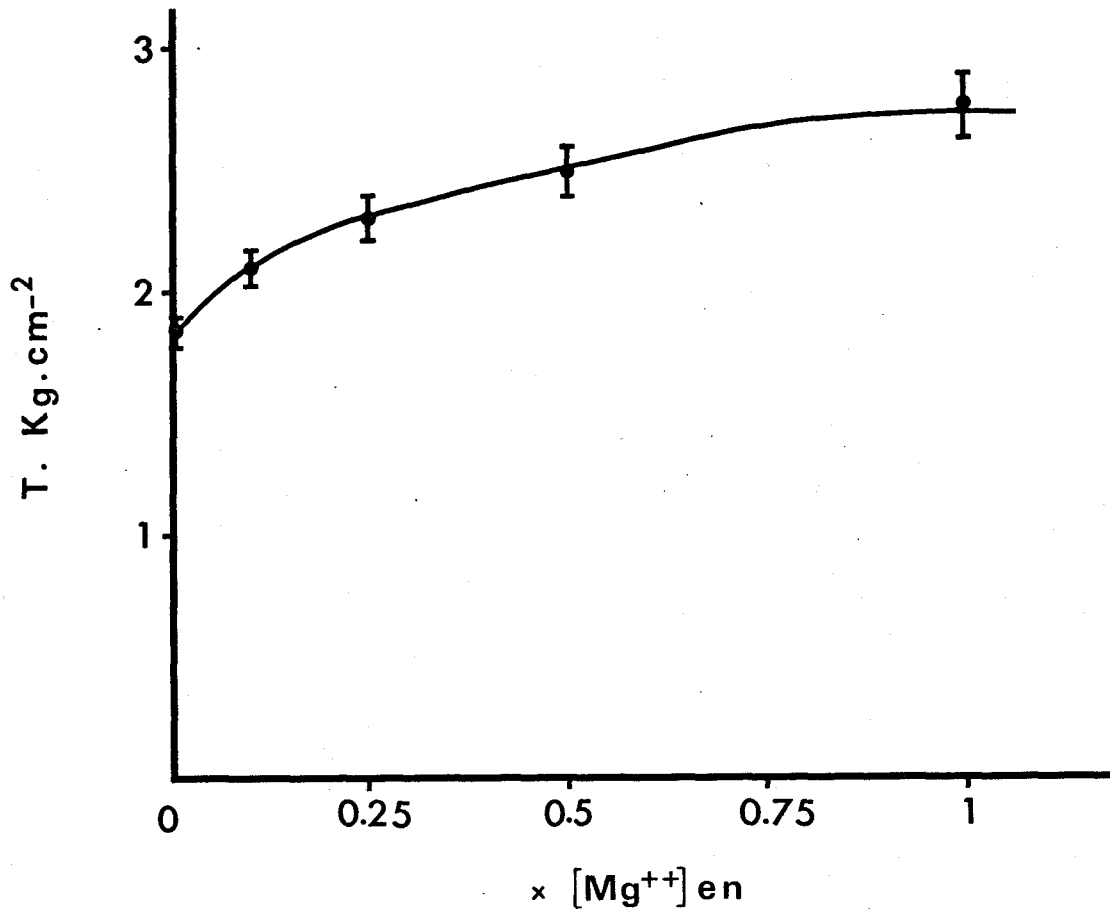


Figure 42

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le  $\text{K}^+$  en excès (258 mM), exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ , en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{Mg}^{++}$ .

La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8\text{mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6\text{mM}$  ;  $\text{K}^+ = 258\text{mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7\text{mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6\text{mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 122,55\text{mM}$  et  $\text{Mg}^{++} = 23,6\text{mM}$  pour une concentration extracellulaire normale (e n) en  $\text{Mg}^{++}$  représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. La réduction de la concentration en  $\text{Mg}^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu du  $\text{MgCl}_2$ . Le maintien de la concentration en  $\text{Cl}^-$  est obtenu par rapport convenable de chlorhydrate de choline). La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes dans chaque milieu testé mais non enrichi en  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 8$ ).

D'après FALEMPIN (1972).

$Mg^{++}$  est prépondérante au niveau membranaire et aboutit à une inhibition de la conductance calcique. Cet effet inhibiteur du  $Mg^{++}$ , maintenant bien connu, a été signalé dès 1965-1966 par GUILBAULT et coll. (1965, 1966) et GUILBAULT (1966) sur la fibre cardiaque.

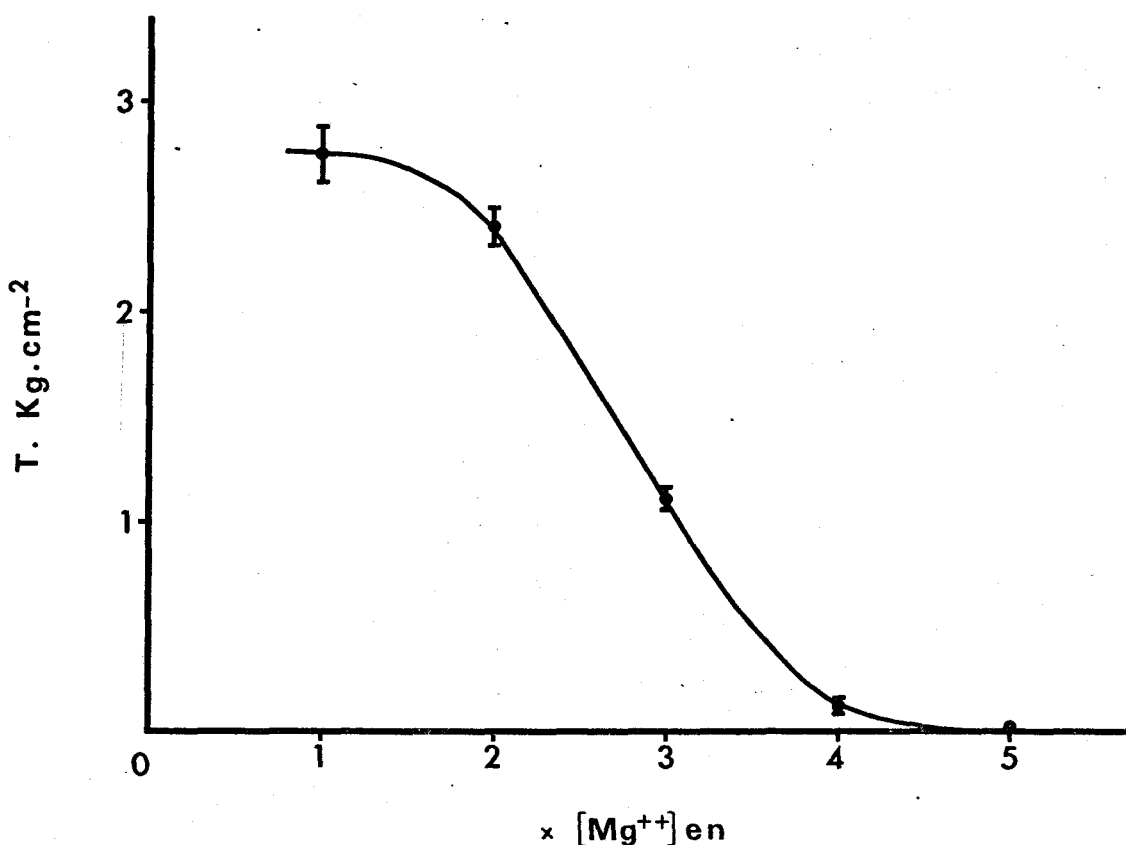


Figure 43

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le  $K^+$  en excès (258 mM), exprimée en Kg.cm<sup>-2</sup>, en fonction de la concentration extracellulaire en  $Mg^{++}$ .

La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 258$  mM ;  $Cl^- = 596,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM ;  $SO_4^{--} = 122,55$  mM et  $Mg^{++} = 23,6$  mM pour une concentration extracellulaire normale (e n) en  $Mg^{++}$  représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. L'apport de  $Mg^{++}$  est réalisé sous forme de  $SO_4^{--}$ . La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé mais non enrichi en  $K_2SO_4$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  (n = 8).  
D'après FALEMPIN (1972).

## 2.2. Influence des ions $Ca^{++}$

Le rôle capital de ces ions a été mis en évidence par de très nombreux auteurs, citons pour les revues de question (SANDOW, 1965, 1970 ; FUCHS, 1974 ; EBASHI, 1976 ; GILLIS, 1977 ; ENDO, 1977). De même, en ce qui concerne la fibre de crabe, la figure 44 montre qu'une réduction de la concentration en  $Ca^{++}$  du milieu externe entraîne une diminution de la tension. La réduction de la concentration en  $Ca^{++}$  externe au 1/10 de sa valeur normale entraîne la disparition complète du phénomène mécanique. L'entrée de  $Ca^{++}$  réduite en milieu sans  $Ca^{++}$  plaide en faveur de la diminution de tension mécanique enregistrée. Par contre, un accroissement de la concentration externe en  $Ca^{++}$  entraîne, dans certaines limites, ainsi que le montre la figure 45, une augmentation de la tension maximale de contracture. De fait, la tension maximale est obtenue pour une concentration de  $Ca^{++}$  équivalente à 3 fois la concentration normale. Elle atteint alors une valeur moyenne de  $4,59 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Pour des accroissements plus importants de la concentration en  $Ca^{++}$ , la tension maximale de contracture diminue puis se stabilise pour des valeurs comprises entre 10 fois et 15 fois la concentration normale de  $Ca^{++}$ . Pour l'étude de l'effet de ces milieux, les fibres sont baignées pendant 10 minutes (temps permettant d'obtenir l'effet maximal) par le milieu de concentration modifiée en  $Ca^{++}$  avant d'être soumises à l'action du milieu hyperpotassique de même concentration en  $Ca^{++}$ . L'augmentation de la tension observée pour des milieux moyennement enrichis en  $Ca^{++}$  peut là encore s'interpréter sur la base d'une entrée accrue de  $Ca^{++}$  au moment de la dépolarisation membranaire. Quant à la chute observée pour des concentrations plus importantes, elle ne peut être expliquée par l'accroissement de la pression osmotique, voir de la force ionique du milieu. De fait, l'apport de  $Ca^{++}$  est réalisé sous forme de propionate (sel entièrement dissocié) et la force ionique du milieu n'est sensiblement pas modifiée ; ainsi, l'activité du  $Ca^{++}$  dans ces solutions varie linéairement avec la concentration de cet ion dans le milieu externe. Toutefois, un accroissement de plus en plus important de la teneur en  $Ca^{++}$  du milieu externe pourrait provoquer une entrée très importante de  $Ca^{++}$  et, de ce fait, une plus forte libération de  $Ca^{++}$  par le reticulum sarcoplasmique. Cet influx de  $Ca^{++}$  permettant une stimulation du reticulum sarcoplasmique selon l'une ou l'autre des deux modalités envisagées à l'heure actuelle : couplage par dépolarisation du reticulum



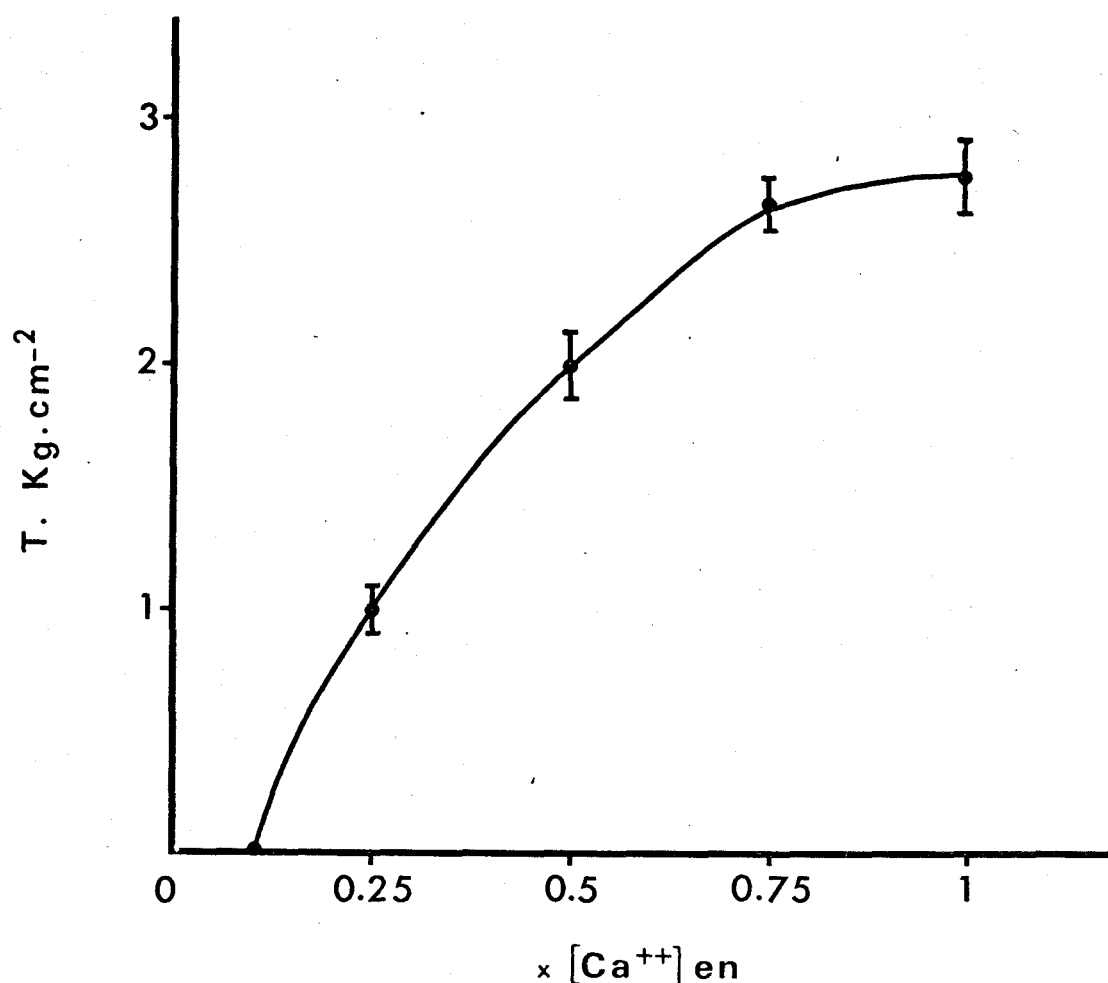


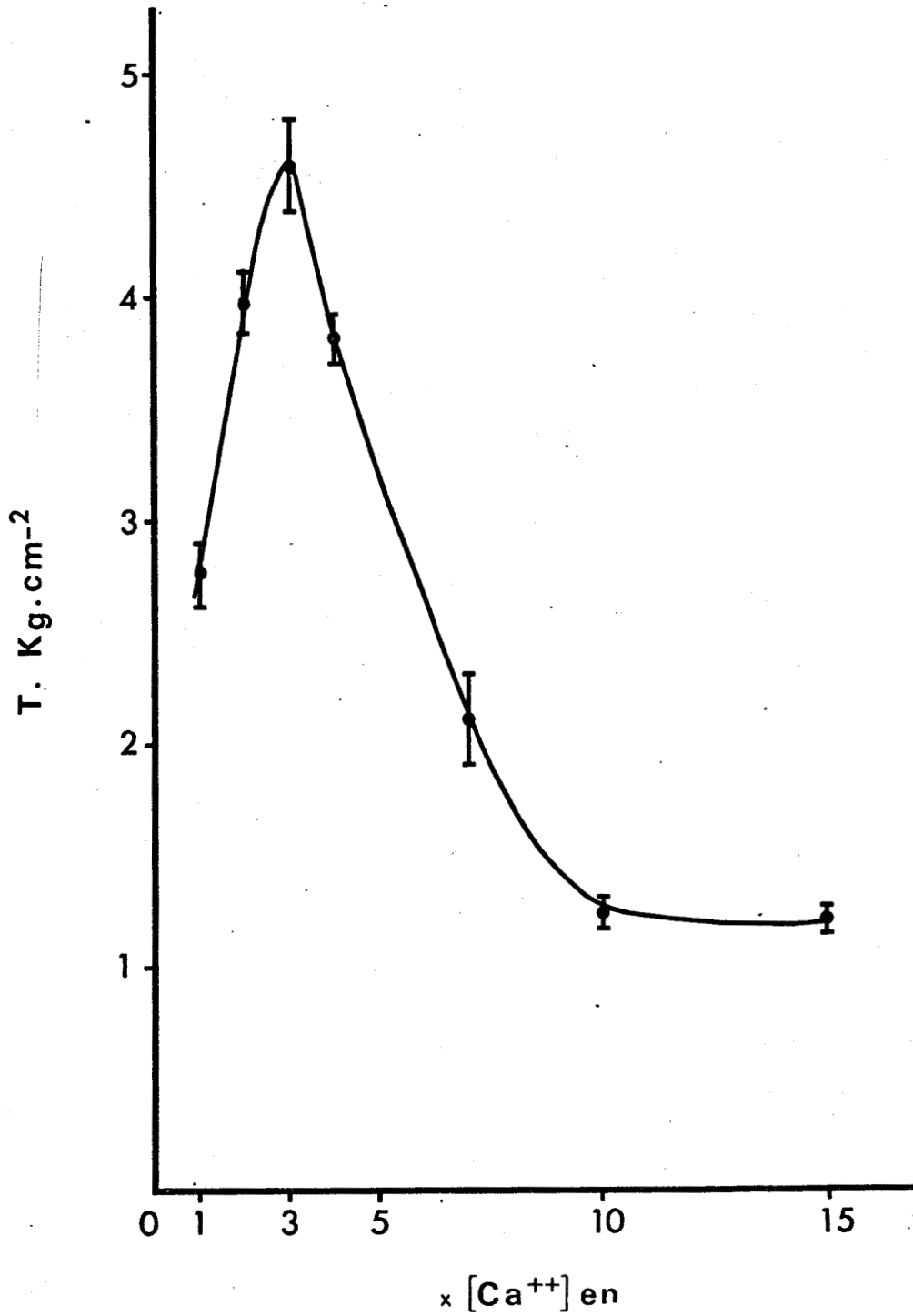
Figure 44

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le  $K^+$  en excès (258 mM), exprimée en  $Kg.cm^{-2}$ , en fonction de la concentration extracellulaire en  $Ca^{++}$ .

La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  
 $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 258$  mM ;  $Cl^- = 596,7$  mM ;  
 $CO_3H^- = 2,6$  mM ;  $SO_4^{--} = 122,55$  mM et  $Ca^{++} = 11,8$  mM pour une concentration extracellulaire normale (e n) en  $Ca^{++}$  représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. La réduction de la concentration en  $Ca^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu du  $CaCl_2$  (le maintien de la concentration en  $Cl^-$  est obtenu par apport convenable de chlorhydrate de choline). La fibre est au préalable pré-traitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé mais non enrichi en  $K_2SO_4$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  (n = 8).

sarcoplasmique ou couplage indirect (l'accroissement de  $\text{Ca}^{++}$  au niveau des citernes du reticulum sarcoplasmique induisant la libération du  $\text{Ca}^{++}$  réticulaire). Dans ces conditions, une concentration interne en  $\text{Ca}^{++}$ , au contact des myofilaments, trop importante aboutirait à une inhibition de



l'activation du mécanisme myofibrillaire et de l'activité ATPasique. En effet, l'activation est maximale pour une concentration en  $\text{Ca}^{++}$  égale à 1 mM, au-delà est observée une réduction de l'activité ATPasique et de la tension développée par les myofilaments (voir chapitre II et III).

### 2.3. Conclusion

Le développement de la tension maximale de la contracture potassique est donc lié à la présence dans le milieu externe de  $\text{Mg}^{++}$  et de  $\text{Ca}^{++}$ . L'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  au moment de la dépolarisation membranaire est régulée par la présence du  $\text{Mg}^{++}$ , indépendamment des effets propres du  $\text{Mg}^{++}$  au niveau des protéines de structure. En augmentant la concentration extracellulaire de  $\text{Mg}^{++}$ , il en résulte une entrée moins importante de  $\text{Ca}^{++}$  et de ce fait une tension mécanique plus faible. Dès lors, si la concentration de  $\text{Ca}^{++}$  est accrue simultanément, et dans les mêmes proportions que celle du  $\text{Mg}^{++}$ , dans le but de maintenir un rapport  $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$  constant, l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  devrait être identique et de ce fait, la tension mécanique de contracture résultante maintenue à sa valeur de référence. De fait, la figure 46 montre que si les concentrations en  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  sont augmentées simultanément, la tension mécanique reste constante. Ainsi, il est

### Figure 45

*Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le  $\text{K}^+$  en excès (258 mM), exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ , en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$ .*

*La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  $\text{Mg}^{++} = 23,6$  mM ;  $\text{Na}^+ = 515,6$  mM ;  $\text{K}^+ = 258$  mM ;  $\text{Cl}^- = 596,7$  mM ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6$  mM ;  $\text{SO}_4^{--} = 122,55$  mM et  $\text{Ca}^{++} = 11,8$  mM pour une concentration extracellulaire normale (e n) en  $\text{Ca}^{++}$  représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ . La fibre est au préalable pré-traitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé, mais non enrichi de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .*

*Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 8$ ).*

*Courbe publiée aux C. R. Acad. Sc., Paris, 275, 1649-1652 par BRULE et coll. (1972).*

montré, au niveau de cette préparation, d'une part l'existence d'une régulation de l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  par le  $\text{Mg}^{++}$  et d'autre part que les effets du  $\text{Mg}^{++}$  ne s'expliquent pas par l'hypothèse selon laquelle il intervient comme un  $\text{Ca}^{++}$  faible. L'entrée de  $\text{Ca}^{++}$ , dépendante du  $\text{Mg}^{++}$ , est également soumise aux effets d'autres ions, et notamment à ceux des ions  $\text{Na}^+$ .

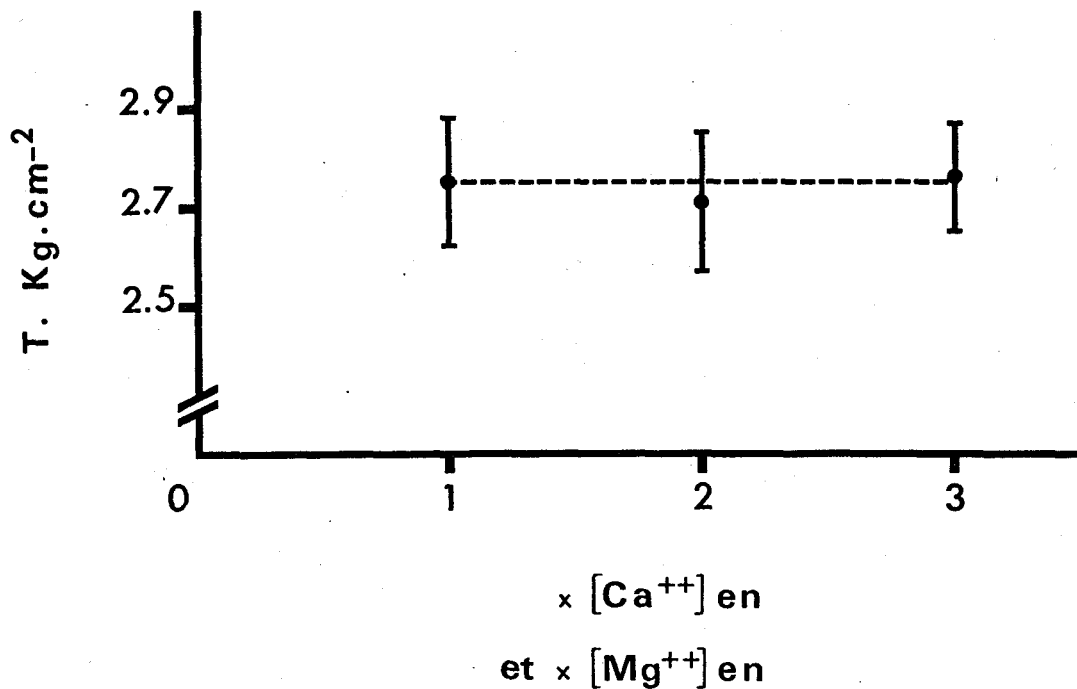


Figure 46

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le  $\text{K}^+$  en excès (258 mM), exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ , en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  (maintien du rapport des concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  et de  $\text{Mg}^{++}$  à la valeur de référence soit  $11,8/23,6 = 0,5$ ).

La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  $\text{K}^+ = 258 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$  ;  $\text{SO}_4^{--} = 122,55 \text{ mM}$  et  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$ ,  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  pour des concentrations extracellulaires normales (e n) respectives en  $\text{Ca}^{++}$  et en  $\text{Mg}^{++}$  représentées sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ , celui de  $\text{Mg}^{++}$  sous forme de  $\text{SO}_4^{--}$ . La fibre est au préalable prétraitée pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé mais non enrichi en  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 6$ ).

### 3 - Effets de l'absence de Na<sup>+</sup>. Importance sur les tensions mécaniques en milieu riche en Ca<sup>++</sup>

L'existence de l'antagonisme Ca<sup>++</sup>-Na<sup>+</sup> a été particulièrement étudiée sur la structure cardiaque par NIEDERGERKE et LÜTTGAU (1957), LÜTTGAU et NIEDERGERKE (1958). Mais dès 1921, DALY et CLARK observent que la suppression partielle du chlorure de sodium externe provoque une augmentation de la force contractile. LÜTTGAU et NIEDERGERKE (1958) précisent la relation de WILLBRANDT et KOLLER (1948) selon laquelle la tension est dépendante du rapport  $[Ca^{++}] / [Na^+]^2$  de la solution environnante. Ainsi, l'augmentation de ce rapport réduit le niveau de dépolarisation nécessaire à l'obtention d'une tension donnée. D'autre part, au niveau du muscle atrial de grenouille, HORACKOVA et VASSORT (1976) montrent que la composante tonique de l'activité mécanique est régulée par l'échange Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> et suggèrent que plus de 2 ions Na<sup>+</sup> (probablement 4 ou plus) sont échangés pour chaque Ca<sup>++</sup>. Parallèlement, MILLER et MOISESCU (1976) montrent que pour des concentrations basses de Na<sup>+</sup>, la tension dépend de la valeur absolue des concentrations de Ca<sup>++</sup> et de Na<sup>+</sup> externe et à un taux vraiment faible de Na<sup>+</sup> (< à 0,2 mM) la force contractile apparaît ne dépendre que de la  $[Ca^{++}]_e$ . Toutefois pour des changements modérés des concentrations en Ca<sup>++</sup> et Na<sup>+</sup> la force contractile est montrée être corrélée au rapport  $[Ca^{++}]_e / [Na^+]_e^2$  (BENNINGER et coll., 1976 ; CHAPMAN et TUNSTALL, 1971). L'antagonisme Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> survient dans une région des fibres musculaires très accessible au milieu environnant à savoir la membrane cellulaire (CHAPMAN et TUNSTALL, 1969). La force contractile est également montrée dépendante, sous certaines conditions de la concentration intracellulaire de Na<sup>+</sup> (VASSORT, 1972 ; CHAPMAN, 1974). Cette dernière est elle-même dépendante de la concentration externe. C'est ainsi que ELLIS (1977) montre sur les fibres de Purkinje qu'une réduction du Na<sup>+</sup> externe produit une chute rapide et réversible de la concentration en Na<sup>+</sup> interne, comme celle observée sur la fibre de crabe par VAUGHAN-JONES en 1976. D'autre part, au niveau des muscles de crustacés, ASHLEY et coll. (1974) indiquent que le système Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup> dépend du gradient de ces ions et que lorsque le Na<sup>+</sup> externe est réduit, il existe une augmentation de l'influx de Ca<sup>++</sup> en même temps qu'une diminution de l'efflux. Cette diminution de l'efflux de Ca<sup>++</sup> et l'augmentation de l'influx, consécutives à la réduction du Na<sup>+</sup> extracellulaire, provoquant un accroissement du Ca<sup>++</sup> intracellulaire est par



ailleurs connu (NIEDERGERKE, 1963 ; REUTER et SEITZ, 1968). Sur le muscle rétracteur antérieur du byssus de moule, SUGI et YAMAGUCHI (1976) montrent cependant que les réponses électriques et mécaniques aux ions  $K^+$  ne sont pas modifiées même si tout le  $Na^+$  externe est remplacé par la choline. Toutefois, certaine préparation, telle que le ventricule de poisson rouge, présente, après traitement en milieu sans  $Na^+$ , une augmentation de l'influx de  $Ca^{++}$  et de la contracture, lorsque la concentration extracellulaire de  $Na^+$  passe de 0 à 14 mM, ce qui ne peut donc être expliquée sur la base de l'antagonisme  $Ca^{++}-Na^+$  (BUSSELEN et VAN KERKHOVE, 1975).

Au niveau de notre préparation, la concentration extracellulaire en  $Na^+$  est très importante et c'est ainsi que la tension de contracture et les seuils d'activation sont modifiés selon la présence ou l'absence dans le milieu environnant d'ions  $Na^+$  (remplacés par les ions choline). Une partie des résultats exposés ci-après a fait, par ailleurs, l'objet d'une publication (BRULE et coll., 1972).

### 3.1. Effet de l'absence de $Na^+$ sur la relation

$$\text{Tension} = f [K^+]_e$$

Le chlorure de  $Na^+$  est remplacé par le chlorure de choline. La fibre musculaire de crabe est baignée, pendant 10 minutes, par ce milieu dépourvu de  $Na^+$  avant d'être soumise soudainement à l'action de ce milieu enrichi en  $K^+$ . Précisons toutefois que lors de l'application du milieu sans  $Na^+$ , il apparaît fréquemment une contracture très lente et plus durable que la contracture potassique. En fait, il se forme à des endroits toujours différents selon les préparations une "boule blanche" qui se propage le long de la fibre. Ce phénomène transitoire ne semble cependant pas résulter d'une lésion de la fibre en ce sens qu'elle répond normalement par la suite à l'application du milieu enrichi en  $K^+$  et que d'autre part, elle présente à l'examen binoculaire un aspect parfaitement normal. Quoiqu'il en soit, le prétraitement des préparations musculaires par un milieu sans  $Na^+$  entraîne un déplacement du seuil d'activation du mécanisme contractile dans le sens des hyperpolarisations ainsi que l'atteste la figure 47. En effet, si la courbe reliant la tension mécanique de contracture à la concentration extracellulaire de  $K^+$  est toujours d'allure sigmoïde, elle se trouve déplacée dans le sens des hyperpolarisations

membranaires. En absence de  $\text{Na}^+$ , l'application d'un milieu renfermant trois fois la concentration extracellulaire normale en  $\text{K}^+$  provoque l'apparition d'une contracture égale à  $0,22 \text{ Kg.cm}^{-2}$  alors qu'en présence de  $\text{Na}^+$ , 12 fois la concentration normale en  $\text{K}^+$  sont requis pour déclencher une

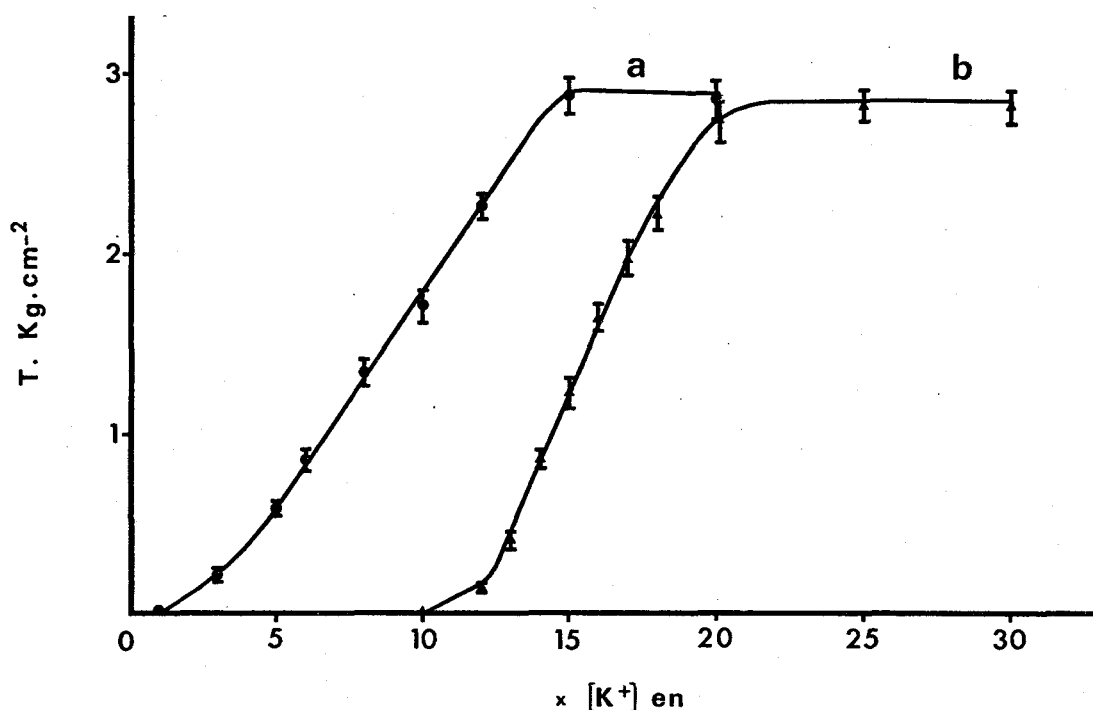


Figure 47

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures, exprimée en  $\text{Kg.cm}^{-2}$ , en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$ , en absence (a) (reste  $2,6 \text{ mM}$  sous forme de  $\text{CO}_3\text{H}^-\text{Na}^+$ ) ou en présence (b) de  $\text{Na}^+$ .

La concentration extracellulaire normale (e n) en ions est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . L'absence d'ions  $\text{Na}^+$  (suppression du  $\text{NaCl}$ , courbe a) est compensée par apport d'ions choline (Chlorhydrate de choline =  $513 \text{ mM}$ ) de façon à maintenir la concentration extracellulaire normale en  $\text{Cl}^-$ . La variation de la concentration en  $\text{K}^+$  est obtenue avec une modification simultanée de la concentration en  $\text{SO}_4^{--}$  (apport de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ). Pour le milieu dépourvu d'ions  $\text{Na}^+$ , la fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans ce milieu non enrichi en  $\text{K}_2\text{SO}_4$ .

Chaque point des courbes représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 9$ ).

Courbe publiée aux C. R. Acad. sc., Paris, 275, 1649-1652 par BRULE et coll. (1972).



contracture d'égale amplitude ( $0,15 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ). De même, si l'activation maximale est atteinte en présence de  $\text{Na}^+$  pour 20 fois la concentration externe de  $\text{K}^+$ , elle l'est, en absence de  $\text{Na}^+$ , dès que cette concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  a atteint 15 fois la valeur de référence. La même tension maximale égale à  $2,8 \text{ Kg.cm}^{-2}$  est alors enregistrée. Au-delà, la tension demeure stable.

Ce résultat peut surprendre dans la mesure où en absence de  $\text{Na}^+$  au niveau des myofilaments, la tension mécanique qui peut être développée atteint environ  $4 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . En effet, l'absence externe de  $\text{Na}^+$  aboutit à une réduction du  $\text{Na}^+$  intracellulaire comme le montre VAUGHAN-JONES (1976) sur la même préparation de fibre musculaire de crabe. Dans de telles conditions, la tension maximale, identique à celle obtenue en présence de  $\text{Na}^+$ , conduit à penser que la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  au contact des myofilaments est plus faible dans la mesure où une même concentration de  $\text{Ca}^{++}$  aboutit au développement d'une contraction des myofilaments beaucoup plus importante en absence qu'en présence de  $\text{Na}^+$  (chapitre III). D'autre part, la levée de l'antagonisme  $\text{Ca}^{++}$ - $\text{Na}^+$  par la suppression du  $\text{Na}^+$  externe aboutit à une entrée plus importante de  $\text{Ca}^{++}$ . Cependant, la concentration interne de  $\text{Ca}^{++}$  dépend non seulement de l'entrée mais également du  $\text{Ca}^{++}$  libéré par le R.S. ainsi que de la reprise de  $\text{Ca}^{++}$  libéré. Dans ces conditions, la concentration interne, présumée plus faible, de  $\text{Ca}^{++}$  en absence de  $\text{Na}^+$  peut résulter, ainsi que cela sera vu ultérieurement, d'une réduction de la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. comme l'ont montré VASSORT (1973), BRULE et coll. (1977 b). Ainsi, en dépolarisant plus fortement la membrane (milieu enrichi 20 fois au lieu de 15 fois en  $\text{K}^+$ ), l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  pourrait être plus importante et la tension de contracture plus forte. Or, il se trouve que la tension reste identique (Fig. 47). Toutefois dans ce cas, la concentration externe très forte en  $\text{K}^+$  aboutit à un déplacement important de la valeur de la pile au  $\text{K}^+$  ( $E_K$ ) vers les valeurs plus positives. En supposant comme valeur pour  $[K^+]_i$  120 mM (PROSSER et BROWN, 1962) à  $20^\circ \text{ C}$ , pour une concentration externe en  $\text{K}^+$  de 20 fois la normale,  $E_K$  est égale à 19 mV alors que pour 15 fois, la valeur de  $E_K$  n'est que de 12 mV. Dans de telles conditions une entrée passive de  $\text{K}^+$  plus importante avec 20 fois la concentration externe en  $\text{K}^+$  entraînerait un accroissement de la concentration de  $\text{K}^+$  au contact des myofilaments qui conduit à une diminution de la tension mécanique (voir

chapitre précédent). En absence de  $\text{Na}^+$ , il y aurait donc un compromis entre l'augmentation de la concentration interne de  $\text{Ca}^{++}$  qui tendrait à augmenter la tension mécanique et l'augmentation de celle en  $\text{K}^+$  qui en revanche tendrait à diminuer cette tension d'autant que HAJDU (1953) sur le muscle cardiaque montre que l'accroissement de la teneur en ions  $\text{K}^+$  du milieu intracellulaire conduit à une diminution de la force contractile. Dans ces conditions, seule l'augmentation en  $\text{Ca}^{++}$  du milieu extracellulaire pourrait alors entraîner le développement d'une tension plus importante.

### 3.2. Influence de l'absence de $\text{Na}^+$ sur la concentration optimale externe de $\text{Ca}^{++}$ permettant l'activation maximale

La concentration extracellulaire qui permet d'obtenir la tension de contracture maximale en présence de  $\text{Na}^+$  est égale à 3 fois la normale, or, ainsi que le montre la figure 48, en absence de  $\text{Na}^+$ , elle est plus importante puisque égale à 7 fois la normale. De même, pour une concentration de  $\text{Ca}^{++}$  égale à 10 fois la normale, pour une même force ionique, une même pression osmotique, la tension varie énormément selon qu'il y ait ou non du  $\text{Na}^+$  dans le milieu environnant (substitution de l'ion  $\text{Na}^+$  par l'ion choline) à savoir respectivement  $1,24 \text{ Kg.cm}^{-2}$  et  $4,20 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Ainsi, l'hypothèse selon laquelle en absence de  $\text{Na}^+$ , la concentration interne de  $\text{Ca}^{++}$  serait plus faible (activation moindre du mécanisme myofibrillaire) peut être rapportée à l'étude du potentiel d'action qui, en absence de  $\text{Na}^+$ , présente un overshoot durable (HAUDECOEUR, 1971 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a). En effet, de part la nature calcique de ce potentiel d'action, l'overshoot durable peut résulter d'un maintien de la "driving force", en milieu sans  $\text{Na}^+$ , aboutissant à un accroissement lent et moindre du milieu interne en  $\text{Ca}^{++}$  (inhibition de la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S.). Cet accroissement moindre du milieu intracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  est en effet compatible avec une libération moindre du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. du fait de l'absence de  $\text{Na}^+$  interne. Pour ce qui est de la tension maximale, elle est donc obtenue en absence de  $\text{Na}^+$  pour une concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  bien plus forte. Ainsi, la suppression du  $\text{Na}^+$  externe, abaissant la concentration interne en  $\text{Na}^+$  (VAUCHAN JONES, 1976), aboutit

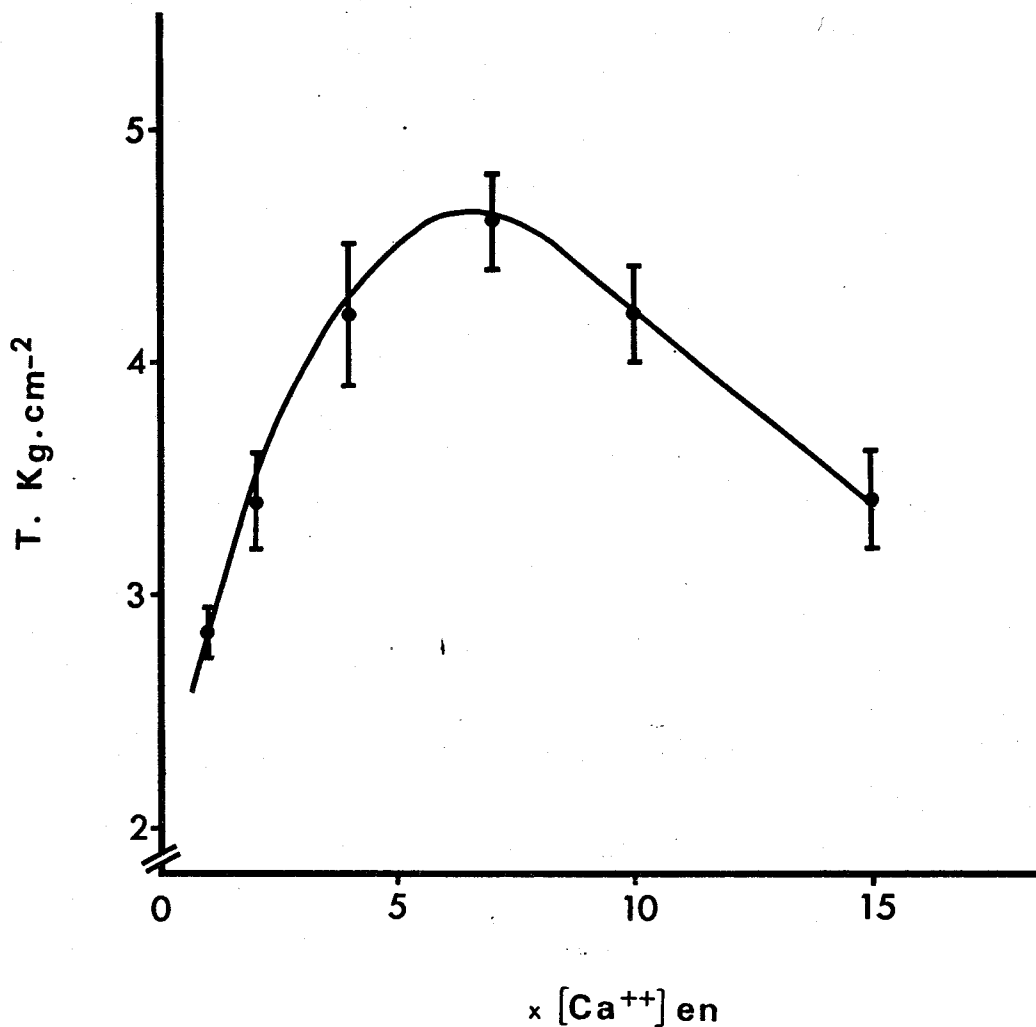


Figure 48

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le  $K^+$  en excès (258 mM), exprimée en  $Kg.cm^{-2}$ , en fonction de la concentration extracellulaire en  $Ca^{++}$ , en absence de  $Na^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $CO_3H^-Na^+$ ).

La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  
 $Mg^{++} = 23,6$  mM ; choline<sup>+</sup> = 513 mM ;  $Na^+ = 2,6$  mM ;  $K^+ = 258$  mM ;  
 $Cl^- = 596,7$  mM ;  $SO_4^{--} = 122,55$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM et  $Ca^{++} = 11,8$  mM  
 pour une concentration extracellulaire normale (e n) en  $Ca^{++}$  représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. L'apport de  $Ca^{++}$  est réalisé sous forme de  $CH_3CH_2COO^-$ . La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé mais non enrichi en  $K_2SO_4$ .

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  (n = 8).

Courbe publiée aux C. R. Acad. Sc., Paris, 275, 1649-1652 par BRULE et coll. (1972).

à une réduction de la libération du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. (VASSORT, 1973 ; HORACKOVA et VASSORT, 1974 ; BRULE et coll., 1977 b). Dans ces conditions, une entrée de  $\text{Ca}^{++}$  beaucoup plus forte est requise pour obtenir l'activation maximale ; entrée plus forte qui peut être obtenue par l'accroissement de la concentration extracellulaire qui conduit à une augmentation de la "driving force" pour le  $\text{Ca}^{++}$ . A l'inverse, en présence de  $\text{Na}^+$ , l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  et le  $\text{Ca}^{++}$  libéré par le R.S. interviennent directement au niveau des myofilaments et, l'activation maximale résultant d'une concentration interne en  $\text{Ca}^{++}$  plus importante est plus rapidement atteinte. D'autre part, comme l'enrichissement en  $\text{K}^+$  du milieu intracellulaire peut conduire à une diminution de la contraction des myofilaments, et dans la mesure où en absence de  $\text{Na}^+$  externe, avec une concentration en  $\text{Ca}^{++}$  normale, le maximum de tension ( $2.8 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ) est atteint pour un enrichissement moindre en  $\text{K}^+$  (15 fois la normale), il peut être attendu que ce milieu externe moins riche en  $\text{K}^+$  (15 fois) puisse induire une contracture de tension maximale ( $4,5 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ) pour une concentration en  $\text{Ca}^{++}$  plus faible. La figure 49 montre, en effet, que la diminution de la "driving force" pour les ions  $\text{K}^+$  permet le développement d'une contracture d'amplitude maximale ( $4,51 \pm 0,18 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ), pour un enrichissement en  $\text{Ca}^{++}$  (3 fois la normale) égal à celui obtenu en présence de  $\text{Na}^+$  pour un milieu plus riche en  $\text{K}^+$  (20 fois la normale) (Fig. 45). En absence de  $\text{Na}^+$ , pour une dépolarisation moindre, l'activation maximale est ainsi obtenue pour une concentration extracellulaire de  $\text{Ca}^{++}$  plus faible.

D'autre part, il est maintenant bien connu que le TEA inhibe entre autre la rectification membranaire liée aux mouvements des ions  $\text{K}^+$  (STANFIELD, 1970 ; KAO et STANFIELD, 1970 ; KEYNES et coll., 1973 ; VASSORT et MOUNIER, 1975 a). Aussi, un prétraitement de notre préparation, par un milieu TEA, pourrait influencer le développement ultérieur de la contracture potassique. De fait, un prétraitement de la fibre de 10 minutes par 20 mM de TEA (temps d'action et concentration suffisantes pour bloquer la rectification retardée (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974)), en absence de  $\text{Na}^+$ , provoque, lors de l'application d'un milieu renfermant 20 fois la concentration normale en  $\text{K}^+$ , une contracture légèrement plus importante ( $3,05 \text{ Kg.cm}^{-2}$  contre  $2,70 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ). De plus, comme le montre la figure 50, la tension maximale ( $4,75 \pm 0,10 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ) dépendante de la concentration extracellulaire de  $\text{Ca}^{++}$  est obtenue pour une concentration

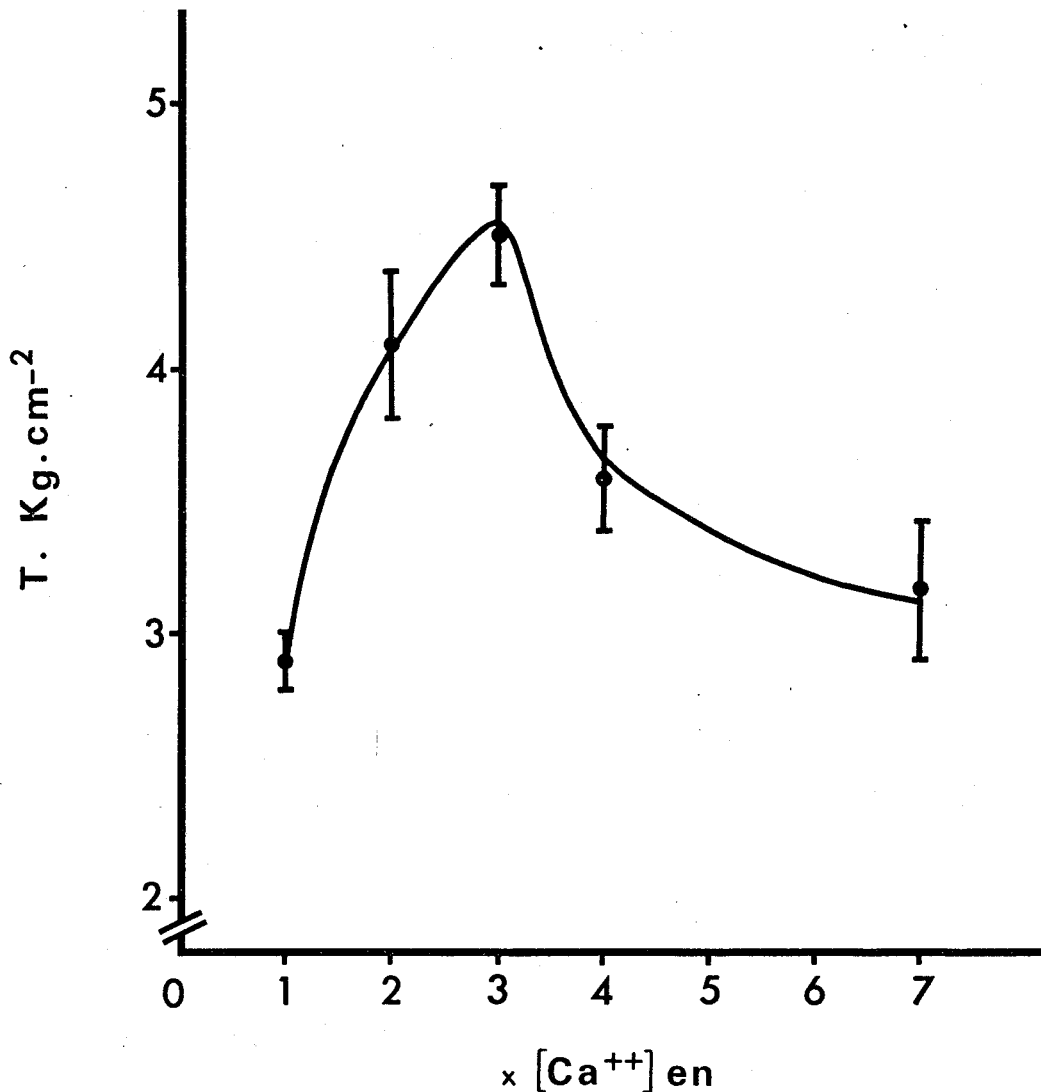


Figure 49

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isol es de crabe lors de contractures provoquées par le K<sup>+</sup> en excès (193,5 mM), exprim e en Kg.cm<sup>-2</sup>, en fonction de la concentration extracellulaire en Ca<sup>++</sup>, en absence de Na<sup>+</sup> (reste 2,6 mM sous forme de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> Na<sup>+</sup>).

La concentration en ions du milieu dépolarisant est :  
 Mg<sup>++</sup> = 23,6 mM ; choline<sup>+</sup> = 513 mM ; Na<sup>+</sup> = 2,6 mM ; K<sup>+</sup> = 193,5 mM ;  
 Cl<sup>-</sup> = 596,7 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 90,3 mM ; CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> = 2,6 mM et Ca<sup>++</sup> = 11,8 mM  
 pour une concentration extracellulaire normale (e n) en Ca<sup>++</sup> représen-  
 t e sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. L'apport de  
 Ca<sup>++</sup> est réalisé sous forme de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>. La fibre est au préalable  
 prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé mais non en-  
 richi en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  (n = 8).

Courbe publi e aux C. R. Acad. Sc., Paris, 275, 1649-1652 par  
 BRULE et coll. (1972).

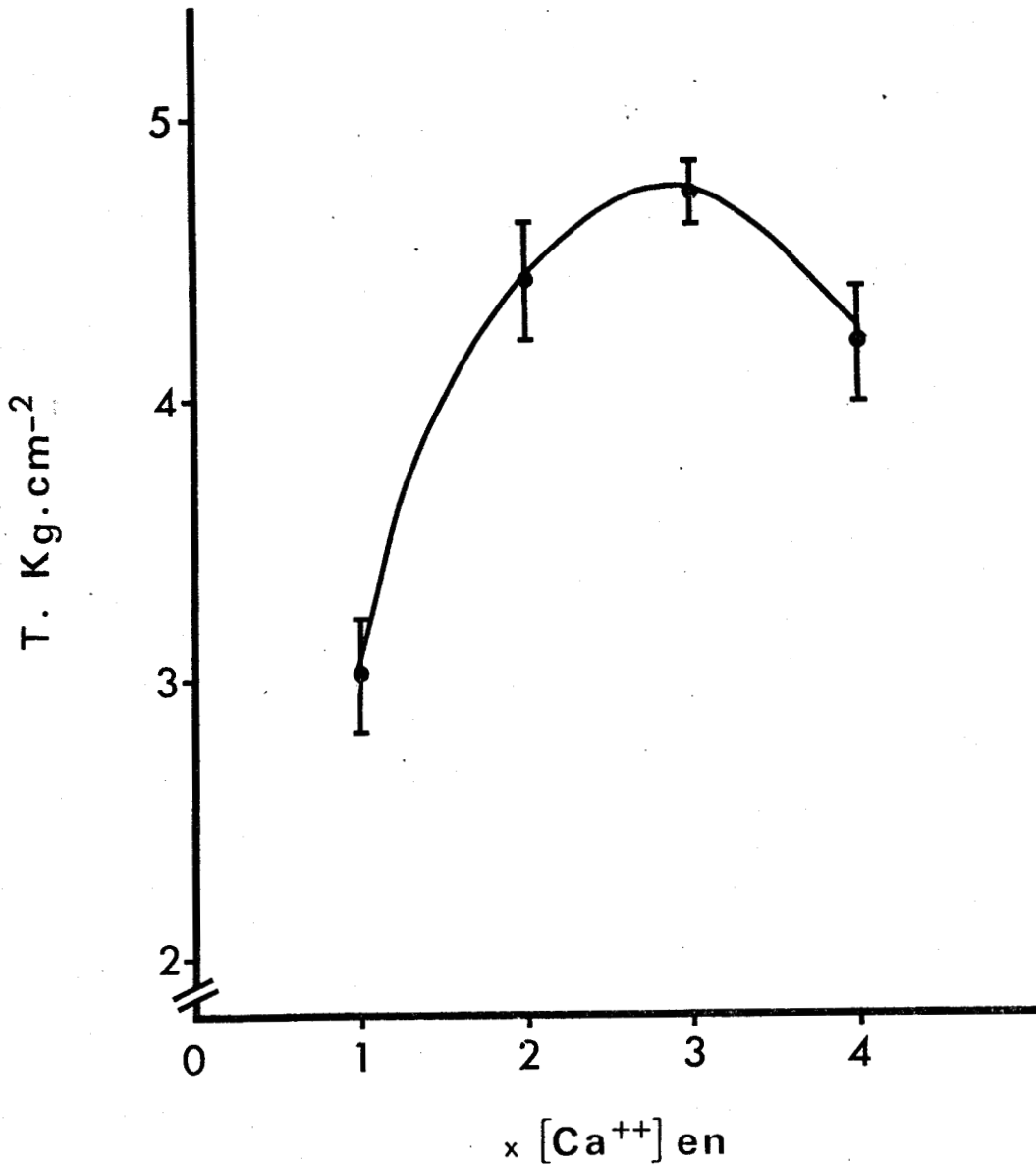


Figure 50

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe lors de contractures provoquées par le K<sup>+</sup> en excès (258 mM), exprimée en Kg.cm<sup>-2</sup> en fonction de la concentration extracellulaire en Ca<sup>++</sup>, en absence de Na<sup>+</sup> (reste 2,6 mM sous forme de CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup>-Na<sup>+</sup>) et en présence de TEA<sup>+</sup> (20 mM).

La concentration en ions du milieu dépolarisant est : Mg<sup>++</sup> = 23,6 mM ; choline<sup>+</sup> = 493 mM ; Na<sup>+</sup> = 2,6 mM ; K<sup>+</sup> = 258 mM ; TEA<sup>+</sup> = 20 mM ; Cl<sup>-</sup> = 596,7 mM ; SO<sub>4</sub><sup>--</sup> = 122,55 mM ; CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> = 2,6 mM et Ca<sup>++</sup> = 11,8 mM pour une concentration extracellulaire normale (e n) en Ca<sup>++</sup> représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. L'apport de Ca<sup>++</sup> est réalisé sous forme de CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>. La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé mais non enrichi en K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  (n = 8).

Courbe publiée aux C. R. Acad. Sc., Paris, 275, 1649-1652 par BRULE et coll. (1972).

de  $\text{Ca}^{++}$  seulement égale à 3 fois la concentration normale. Là encore, la courbe est similaire à celle de la figure 48, mais décalée vers l'origine.

### 3.3. Conclusion

L'activation maximale obtenue en présence de  $\text{Na}^+$  pour un milieu renfermant 3 fois la concentration normale de  $\text{Ca}^{++}$  lors d'une dépolarisation produite par un milieu contenant 20 fois la concentration normale de  $\text{K}^+$ , l'est également pour les mêmes concentrations en  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$ , en absence de  $\text{Na}^+$  à la condition que l'action du milieu dépolarisant soit précédée d'un prétraitement par le TEA. Sous l'influence du TEA, l'entrée moindre de  $\text{K}^+$  conduirait à un enrichissement plus faible en  $\text{K}^+$  et permettrait ainsi une meilleure activation du mécanisme contractile (HAJDU, 1953 ; nos résultats chapitres II et III). Cette hypothèse concernant l'effet du TEA ne peut être expliquée que par l'inhibition, dans les conditions normales d'un courant sortant dynamique de nature potassique activé lors de dépolarisations produites par un excès de  $\text{K}^+$ . De ce fait, une étude complémentaire concernant les effets du TEA devait donc être entreprise. Comme nous allons maintenant le voir, les effets du TEA sur la fibre de grenouille (BENOIT, 1975) et sur la fibre de crabe sont opposés (BRULE et coll., 1976), en ce qui concerne d'une part le développement de la dépolarisation membranaire (amplitude et vitesse) et d'autre part le développement de la contracture déclenchée par l'accroissement soudain de la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$ .

A la suite de ces premiers résultats concernant les contractures potassiques, plusieurs problèmes se posent auxquels une tentative de réponse se devait d'être apportée : le premier concerne la nature ionique du courant sortant compte-tenu des effets opposés du TEA sur la fibre de grenouille et sur celle de crabe ; le 2ème concerne les effets de la modification extracellulaire du  $\text{Cl}^-$ . ; le 3ème concerne la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. et enfin le 4ème concerne l'analyse des composantes de la contracture.



#### 4 - Effets du TEA et de la variation de la concentration de $\text{Cl}^-$ sur la contracture potassique et la dépolarisation

Des variations de conductance de la membrane, fonction du potentiel et du temps, correspondent aux phénomènes de rectification membranaire. Le phénomène de double rectification membranaire ainsi que la nature potassique de la rectification retardée, abolie par le TEA, sur la fibre musculaire de grenouille a été mis en évidence par de nombreux auteurs (KATZ et LOU, 1947 ; KAO et STANFIELD, 1970). Cette rectification retardée se trouve, de même, abolie par le TEA tant sur les fibres squelettiques de grenouille que sur celles de crustacés (STANFIELD, 1970 ; KEYNES et coll., 1973 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 ; MOUNIER et VASSORT, 1975 a et b). De plus, dans des conditions de potentiel imposé, MOUNIER et VASSORT (1975 b) utilisant la technique du double pont de saccharose, sur des fibres isolées (de petit diamètre) de crabe présentant une réponse graduée, montrent que le courant retardé est essentiellement porté par les ions  $\text{K}^+$ . Cependant, sur les fibres de large diamètre qui présentent une réponse par tout ou rien à laquelle est associée une rectification anormale (courant de membrane plus important pour l'hyperpolarisation que pour la dépolarisation pour une même variation absolue du potentiel de membrane par rapport au potentiel de repos), comme l'observent ATWOOD et coll. (1965), l'abolition de la rectification retardée se produit en absence de  $\text{Cl}^-$  extracellulaire (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 ; BRULE et coll., 1976 ; HAUDECOEUR et coll., 1977), le  $\text{Cl}^-$  extracellulaire était remplacé par du méthylsulfate ou du propionate. Dans de telles conditions, cette rectification sous la dépendance du  $\text{Cl}^-$  pourrait être de nature potassique. Toutefois, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974), BRULE et coll. (1976) montrent que ce phénomène de rectification retardée persiste en milieu ne contenant que du chlorure de choline (le pH étant maintenu à sa valeur de référence par addition de 2,6 mM de  $\text{NaHCO}_3$ ). Le problème dès lors posé consiste donc à savoir si la rectification retardée, sur les fibres présentant une réponse par tout ou rien, est due à une variation de la conductance au  $\text{Cl}^-$ , ou à une variation de la conductance au  $\text{K}^+$  dépendant de la concentration en  $\text{Cl}^-$ , ou aux deux. Afin d'essayer de répondre à cette question, une étude comparative, concernant les effets du TEA et de la diminution du  $\text{Cl}^-$  externe sur l'évolution du potentiel de membrane et de la contracture potassique, a été entreprise sur la fibre musculaire de grenouille et sur celle de crabe.

#### 4.1. Effet du TEA sur le couturier de grenouille

Cette partie expérimentale est réalisée sur le couturier de grenouille. Le muscle, après dissection, est dans un premier temps, stabilisé pendant 20 minutes dans le milieu de référence. Il est ensuite pendant 20 minutes en contact avec ce milieu de référence additionné de 58 mM de TEA avant que ne soit enregistrée la contracture produite par l'excès de  $K^+$  extracellulaire. Dans ces conditions, afin de maintenir la concentration extracellulaire en  $Cl^-$  constante et la pression osmotique, le KCl en excès remplace en partie convenable le NaCl. La réversibilité n'est également étudiée qu'après une période de 20 minutes pendant laquelle le muscle est continuellement lavé par la solution de référence. Dans de telles conditions, la figure 51 révèle que la vitesse et la tension mécanique maximale de la contracture développée lors d'un apport de  $K^+$ , sont réversiblement diminuées par le TEA. Une telle concentration de TEA (58 mM) bloque à plus de 85 p. 100 la rectification retardée (STANFIELD, 1970). De ce fait, cette diminution de contracture potassique résulte probablement d'une dépolarisation moindre. Aussi, de façon à le vérifier, le potentiel de membrane est recueilli par microélectrode et est mémorisé sur l'autre voie de l'enregistreur Allcoscript par l'intermédiaire d'un changeur d'impédance. De manière à suivre correctement l'évolution du P M sans artéfact lors de la contracture, le milieu contracturant et la solution de référence sont additionnés de saccharose (290 mM) (ADRIAN et coll., 1970). Dans de telles conditions, la figure 52 montre que la diminution de l'amplitude de la contracture résulte bien d'une diminution réversible de la vitesse et du maximum de dépolarisation consécutive à l'enrichissement du milieu extracellulaire en  $K^+$ . Si, au début de la dépolarisation, le PM atteint une valeur de - 30 mV en 55 secondes en conditions de référence (absence de TEA) et lors de la réversibilité du phénomène, ce potentiel n'est atteint, en présence de TEA, qu'après un temps beaucoup plus long, à savoir, de l'ordre de 100 secondes. De même, le niveau maximal de potentiel atteint lors de la dépolarisation, de l'ordre de - 20 mV, n'est jamais atteint en présence de TEA puisque, dans ces conditions, le potentiel maximum atteint est de - 30 mV.

Les effets du TEA sont identiques à l'action de la 4 aminopyrine sur la même préparation (BENOIT, 1975). La 4 aminopyrine est connue pour bloquer,





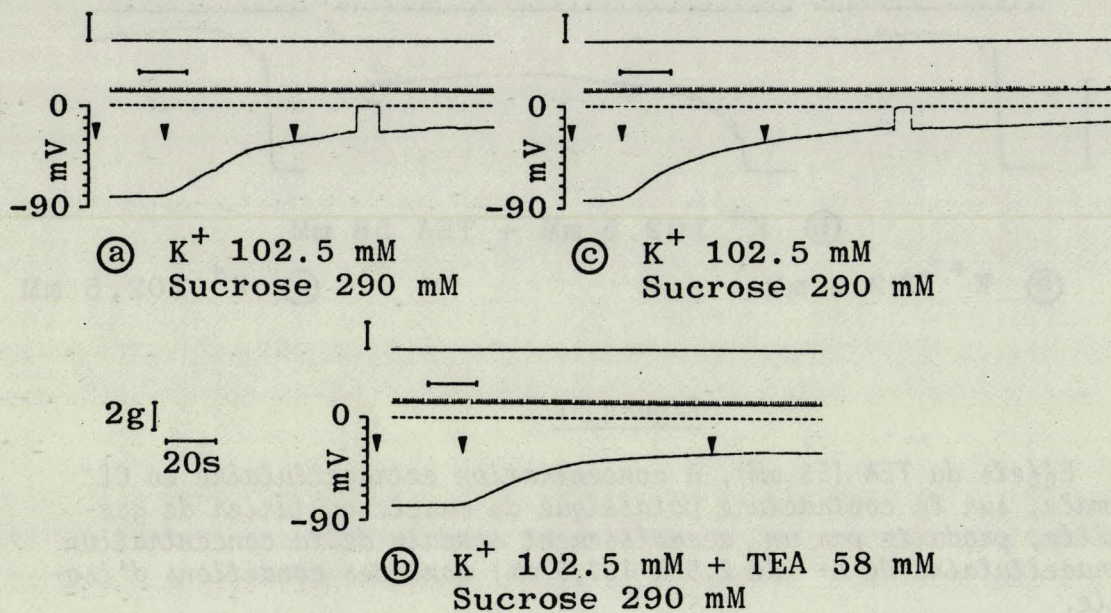


Figure 52

Effets du TEA (58 mM), à concentration extracellulaire en  $Cl^-$  normale, sur la dépolarisation membranaire de la fibre musculaire du couturier de grenouille, produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 2,5 à 102,5 mM) dans des conditions d'hypertonie.

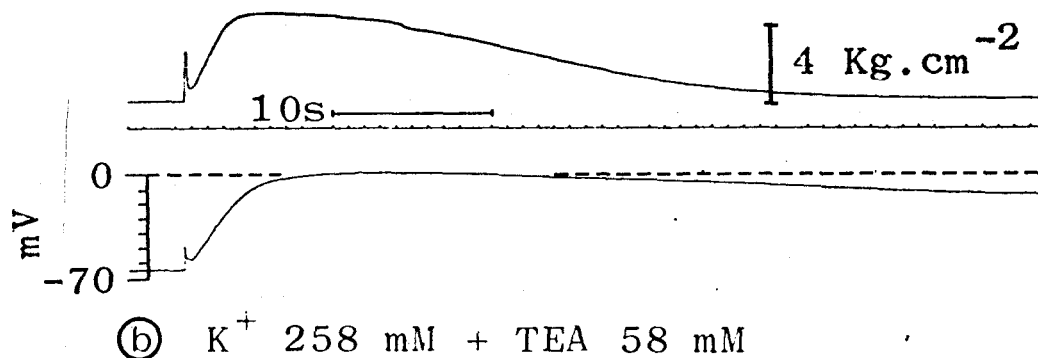
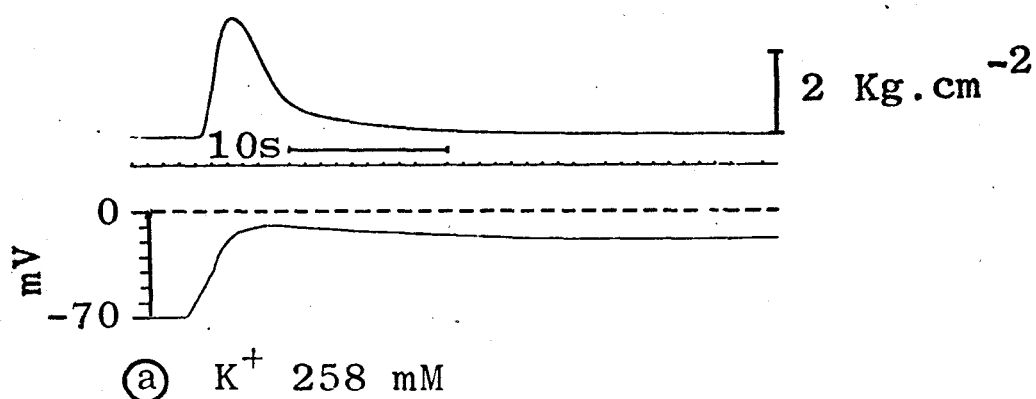
La concentration du milieu de référence hypertonique est :  $Ca^{++} = 1,8$  mM ;  $K^+ = 2,5$  mM ;  $Na^+ = 102,4$  mM ; choline $^+$  = 58 mM ;  $Cl^- = 124,1$  mM ;  $SO_4^{--} = 20$  mM ;  $CO_3H^- = 2,4$  mM ; sucrose = 290 mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $Na^+$  de la solution de référence hypertonique par des ions  $K^+$ . Pour la solution contenant le TEA (b), l'apport de TEA est réalisé en remplaçant les ions choline $^+$  de la solution de référence hypertonique par les ions TEA $^+$ .

Pour chaque épreuve (a), (b) ou (c) : La trace du haut montre l'abolition de la contracture potassique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire : (a) en conditions de référence hypertonique ; (b) - après 20 minutes d'action du TEA ; (c) - après 20 minutes de retour aux conditions initiales de référence hypertonique (réversibilité). Les flèches indiquent le niveau de potentiel correspondant à -30 mV. La seconde flèche (sur chaque tracé) précise également l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée.

#### 4.2. Effets du TEA sur la fibre musculaire de crabe à concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$ normale

Sur cette fibre, si le TEA agit de la même manière sur le courant dynamique de nature potassique, des résultats similaires à ceux obtenus sur la grenouille doivent être attendus. Pour ces préparations, les fibres isolées, avant d'être soumises à l'action du milieu riche en  $\text{K}^+$ , avec ou sans TEA (58 ou 0 mM), sont stabilisées dans le milieu correspondant, de concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  normale, pendant 20 minutes. Les milieux riches en  $\text{K}^+$  sont là encore obtenus par le remplacement mM à mM du NaCl par le KCl. Toutefois, au niveau de cette préparation, la réversibilité de la contracture étant difficilement observable ou après un laps de temps très long ainsi que cela a déjà été précisé, il a été procédé à une étude statistique. La figure 53 donne deux exemples d'enregistrements de la contracture et du potentiel de membrane en absence ou en présence de TEA. A l'inverse de son effet sur la fibre musculaire de grenouille, le TEA (58 mM) provoque un accroissement de l'amplitude tant de la dépolarisation que de la contracture. En effet, l'étude statistique montre que la tension moyenne de contracture enregistrée en absence de TEA est de  $2,78 \pm 0,15 \text{ Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 6$ ) alors qu'elle se trouve être égale à  $4,52 \pm 0,10 \text{ Kg.cm}^{-2}$  en présence de 58 mM de TEA ( $n = 6$ ). Cependant, il est bien connu que sur les fibres musculaires de crustacés, le courant entrant est porté pour une large part par les ions  $\text{Ca}^{++}$  (FATT et GINSBORG, 1958 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a ; MOUNIER, 1975 ; HAUDECOEUR, 1975 ; HENČEK et ZACHAR, 1977). Ce courant entrant calcique pourrait être plus ample ou mieux démasqué sous l'effet de TEA et expliquer l'accroissement de la dépolarisation et de la contracture, d'autant que MOUNIER et VASSORT (1975 a et b) montrent que le courant  $\text{Ca}^{++}$  s'active simultanément avec un courant sortant de  $\text{K}^+$ , de cinétique équivalente, inhibé par le TEA. Aussi, l'expérience a-t-elle été reprise en inhibant le courant entrant par le  $\text{Mn}^{++}$  (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a). Egalement, sur la fibre musculaire de grenouille, CHIARANDINI et STEFANI (1973) montrent que le  $\text{Mn}^{++}$ , bloquant la conductance membranaire au  $\text{Ca}^{++}$ , réduit la contracture potassique ; cette même contracture potassique peut par ailleurs être supprimée par le  $\text{Mn}^{++}$  (SAKAI et coll., 1974). Ces derniers auteurs considèrent que le  $\text{Mn}^{++}$  agit au niveau du tubule transverse pour inhiber l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  mais ne semble pas affecter directement le reticulum sarcoplasmique. Sur le muscle





cardiaque, CHAPMAN et OCHI (1972) montrent que le  $Mn^{++}$  réduit la vitesse de la contracture développée par un milieu contenant du KCl en excès, tandis que l'amplitude de cette contracture est relativement insensible au  $Mn^{++}$ . Cependant, sur les préparations isolées de trabécules auriculaires de grenouille, CHAPMAN et ELLIS (1977 a) montrent que la relation liant la tension mécanique de contracture à la dépolarisation ne se trouve déplacée que vers des concentrations en  $K^+$  plus élevées, donc vers des valeurs moins négatives de potentiel. Ils observent de plus, dans les cellules ventriculaires de grenouille, l'accumulation de cet ion  $Mn^{++}$  qui est augmentée sous l'influence de la stimulation électrique et l'application du milieu dépolarisant (CHAPMAN et ELLIS, 1977 b). Précisons enfin que DEITMER (1977), sur les fibres musculaires de larves d'insectes, suggère que l'ion  $Mn^{++}$ , non seulement réduit le courant entrant calcique, mais aussi le courant sortant présumé être transporté par les ions  $K^+$ . Dans de telles conditions, la présence de  $Mn^{++}$  au niveau de notre préparation doit conduire à une absence d'entrée de  $Ca^{++}$ .

### Figure 53

Effets du TEA (58 mM), à concentration extracellulaire en  $Cl^-$  normale, sur la contracture potassique et la dépolarisation membranaire de la fibre musculaire squelettique isolée de crabe, produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 258 mM) dans des conditions d'isotonie.

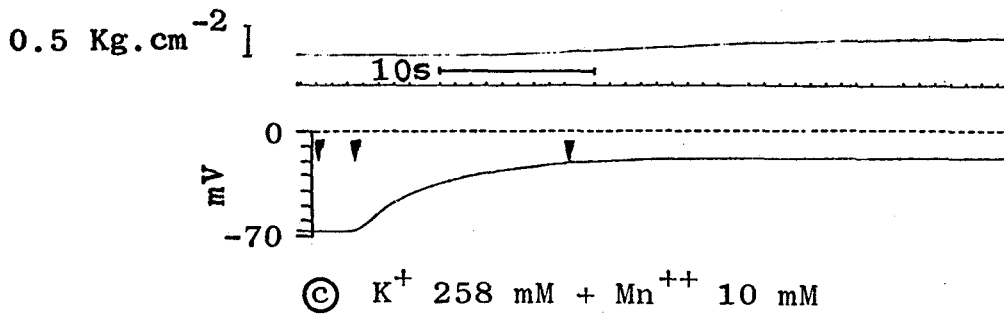
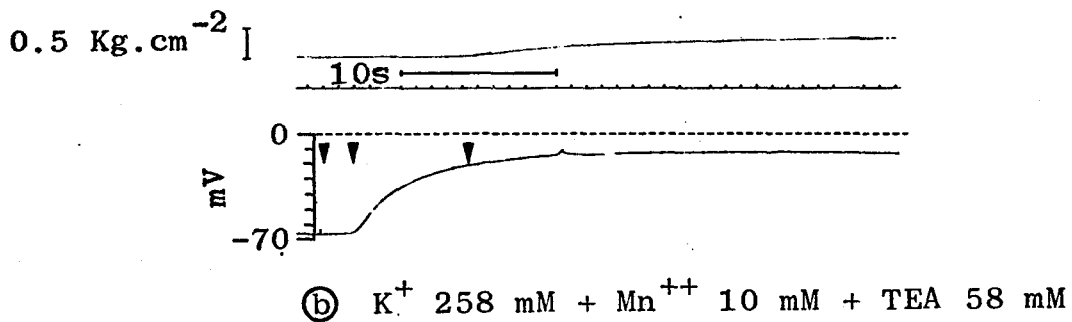
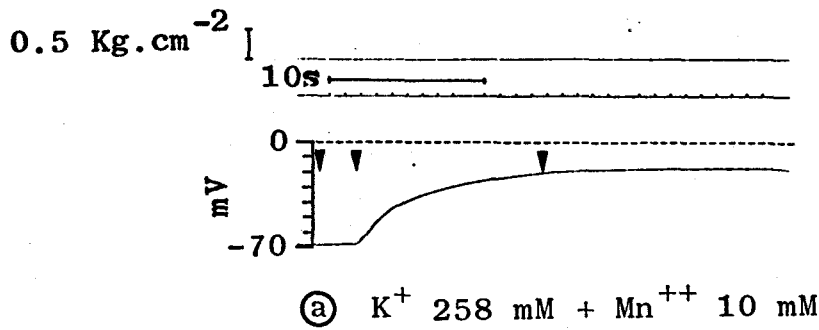
La concentration en ions du milieu de référence choline est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ; choline<sup>+</sup> = 58 mM ;  $Cl^- = 654,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence choline par des ions  $K^+$ . Pour la solution contenant le TEA (b), l'apport de TEA est réalisé en remplaçant les ions choline<sup>+</sup> de la solution de référence choline par les ions TEA<sup>+</sup>.

Pour chaque épreuve (a) et (b) : la trace du haut montre l'enregistrement de la contracture potassique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire.

Les enregistrements sont obtenus sur deux fibres différentes : (a) - après 20 minutes d'action du milieu de référence choline (sans TEA) ; (b) - après 20 minutes d'action du TEA (58mM).

Les fibres sont alors prétraitées pendant 30 minutes en milieu de référence contenant du  $Mn^{++}$  à la concentration de 10 mM (un résultat identique est obtenu avec 20 mM). L'effet maximum du  $Mn^{++}$  sur la fibre de crabe est obtenu dans un temps compris entre 20 et 30 minutes (HAUDECOEUR, et GUILBAULT, 1972 ; HAUDECOEUR, 1975). En présence du tampon bicarbonate, l'addition de  $Mn^{++}$  au liquide de référence (eau de mer artificielle) ne conduit pas, comme dans le cas de la solution de Ringer, à la formation d'un précipité. La valeur du pH est maintenue. Dès lors, le TEA (58 mM) ainsi que le montre la figure 54, accroît réversiblement, à l'inverse de ses effets sur la fibre de grenouille, l'amplitude et la vitesse de dépolarisation déclenchée par l'excès de  $K^+$  extracellulaire. Les résultats présentés sur cette figure 54 correspondent à ceux obtenus pour une fibre musculaire et sont similaires à ceux obtenus pour d'autres fibres dans les mêmes conditions. En fait, comme le montre la figure 54, le développement d'une faible contracture en présence de TEA ne gêne en rien l'analyse de la dépolarisation dans la mesure où, après son effet, une petite contracture de même amplitude est encore observée en milieu riche en  $K^+$  (réversibilité).





Ce résultat, concernant l'effet inverse du TEA observé sur la fibre de crabe, amène à poser l'hypothèse selon laquelle le TEA inhiberait un courant sortant porté par des ions autres que les ions K<sup>+</sup> (Cl<sup>-</sup> éventuellement) passant par le canal de rectification retardée. Cette hypothèse conduit donc à réaliser le même type d'expérience décrit ci-dessus mais en milieu extracellulaire appauvri en Cl<sup>-</sup>. De fait, si le courant passant par le canal de rectification est porté par les ions Cl<sup>-</sup>, il peut être attendu une variation de l'amplitude de la dépolarisation en présence ou en absence de TEA en milieu pauvre en Cl<sup>-</sup> par rapport à celle observée en milieu de [Cl<sup>-</sup>]<sub>e</sub> normale.

### Figure 54

Effets du TEA (58 mM), à concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  normale, en présence de  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM) sur la dépolarisation membranaire d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 258 mM) dans des conditions d'isotonie.

La concentration en ions du milieu de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$  est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ; choline<sup>+</sup> = 58 mM ;  $\text{Mn}^{++} = 10 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 674,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $\text{Na}^+$  du milieu de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$  par des ions  $\text{K}^+$ . Pour la solution contenant le TEA (b), l'apport de TEA est réalisé en remplaçant les ions choline<sup>+</sup> de la solution de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$  par les ions TEA<sup>+</sup>.

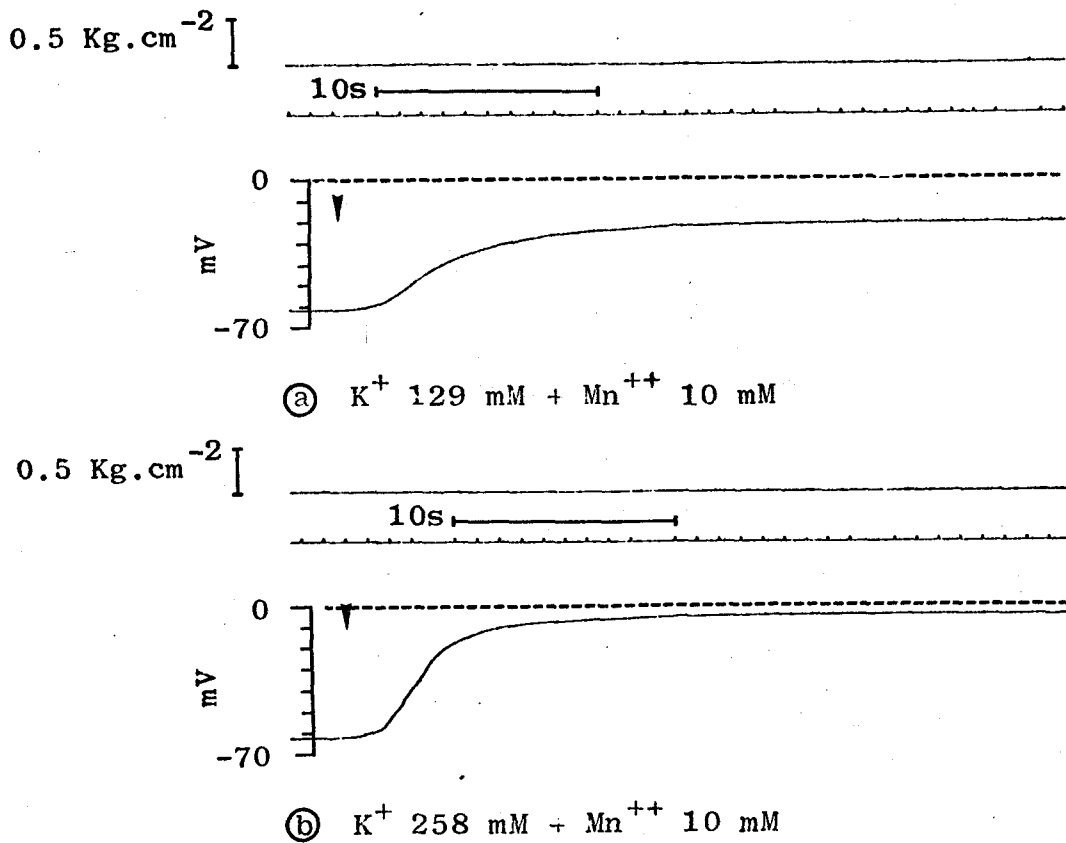
Pour chaque épreuve (a), (b) ou (c) : la trace du haut montre l'abolition (ou la forte diminution) de la contracture potassique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire : (a) - en conditions de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$  après 30 minutes d'action du milieu ; (b) - après 20 minutes d'action du TEA en présence de  $\text{Mn}^{++}$  ; (c) - après 20 minutes de retour aux conditions initiales de référence (a) (réversibilité). Les flèches indiquent le niveau de potentiel correspondant à -20 mV. La seconde flèche (sur chaque tracé) précise également l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée.

#### 4.3. Effets du TEA sur la fibre musculaire de crabe à concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$ réduite

Dans les solutions, où le  $\text{Cl}^-$  est remplacé par du méthylsulfate ou du propionate, la résistance membranaire est accrue (MOUNIER et GUILBAULT, 1970 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 ; HAUDECOEUR, 1975 ; BRULE et coll., 1976). De même, la pente de la relation qui lie le potentiel de membrane au logarithme de la  $[\text{K}^+]_e$ , dans les conditions d'état stable, est plus importante en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  qu'en milieu normal (MOUNIER, 1970 ; GOUBEL, 1973). En effet, la variation du potentiel de membrane est seulement de 32 mV lorsque la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  passe de 12,9 mM à 129 mM en présence d'une concentration de  $\text{Cl}^-$  normale (594 mM) alors qu'elle est de 47 mV en présence de 62,5 mM de  $\text{Cl}^-$  seulement.

En ce qui concerne les expériences qui vont être décrites

ci-dessous, la concentration extracellulaire de  $\text{Cl}^-$  sera amenée à une valeur de 78 mM (correspondant à 58 mM de chlorure de choline ou de TEA et 10 mM de  $\text{MnCl}_2$ ). Ainsi, après avoir équilibré la fibre musculaire de crabe dans une telle solution pauvre en  $\text{Cl}^-$ , pendant 20 minutes, la figure 55 montre que le potentiel de membrane atteint la valeur de  $-20$  mV



avec seulement 129 mM de  $\text{K}^+$  (10 fois  $[\text{K}^+]_e$ ). Cette valeur de potentiel est équivalente à celle atteinte en présence de  $\text{Cl}^-$  à la concentration normale mais pour un enrichissement double du  $\text{K}^+$  extracellulaire (258 mM). Avec un tel enrichissement en  $\text{K}^+$ , 20 fois  $[\text{K}^+]_e$  normale, en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ , la figure 55 montre un accroissement de la vitesse et de l'amplitude de la dépolarisation, le potentiel de membrane atteint la valeur de  $-5$  mV. La présence de  $\text{Cl}^-$  externe semble donc réduire la dépolarisation provoquée

par l'excès de  $K^+$ . Dès lors, il importait de connaître l'effet du TEA (58 mM), en milieu pauvre en  $Cl^-$  (78 mM), sur la dépolarisation membranaire, pour des concentrations externes de  $K^+$  différentes. Avec 258 mM de  $K^+$  externe, la figure 56 montre que le TEA ne modifie que très peu la vitesse et l'amplitude de la dépolarisation. De plus, la présence de

### Figure 55

Effets, à faible concentration extracellulaire en  $Cl^-$  (78 mM), en présence de  $Mn^{++}$  (10 mM), de l'accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 129 mM, (a) ; de 12,9 à 258 mM, (b) sur l'évolution du potentiel membranaire de la fibre musculaire squelettique isolée de crabe.

La concentration en ions du milieu de référence choline,  $Mn^{++}$ ,  $Cl^-$  pauvre est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ; choline $^+$  = 58 mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ;  $Cl^- = 78$  mM ;  $SO_4^{--} = 30,05$  mM ;  $CH_3CH_2COO^- = 536,6$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $Na^+$  de la solution de référence choline,  $Mn^{++}$ ,  $Cl^-$  pauvre par des ions  $K^+$ .

Pour chaque épreuve (a) et (b) : la trace du haut montre l'abolition de la contracture potassique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche (sur chaque tracé) précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (après 30 minutes d'action du milieu de référence choline,  $Mn^{++}$ ,  $Cl^-$  pauvre).

$Mn^{++}$ , inhibant le courant entrant porté par les ions  $Ca^{++}$ , permet de visualiser correctement l'évolution du potentiel de membrane sans artéfact dû à la contracture et de plus, une variation éventuelle de l'amplitude et de la vitesse de dépolarisation ne peut être imputable à l'existence, dans ces conditions, d'un courant entrant de  $Ca^{++}$ . Si peu de variations sont observées en milieu très riche en  $K^+$  (258 mM), il n'en est pas de même en milieu moins enrichi (129 mM). En effet, la figure 57 montre que, dans de telles conditions, la dépolarisation est considérablement freinée en présence de TEA. La vitesse de dépolarisation est sensiblement réduite de moitié et le niveau maximum de potentiel atteint n'est que de - 30 mV

en présence de TEA (58 mM) contre -20 mV en absence de TEA. Ainsi, donc, en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ , le niveau de dépolarisation, dépendant de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$ , a une importance considérable, puisque l'effet du TEA peut être nul voire opposé à celui obtenu en présence d'une  $[\text{Cl}^-]_e$  normale.

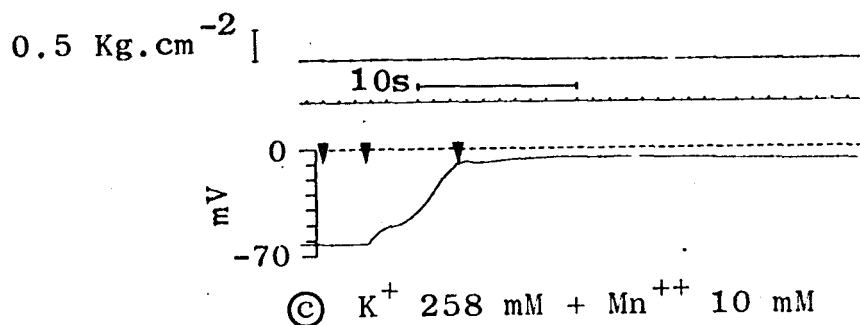
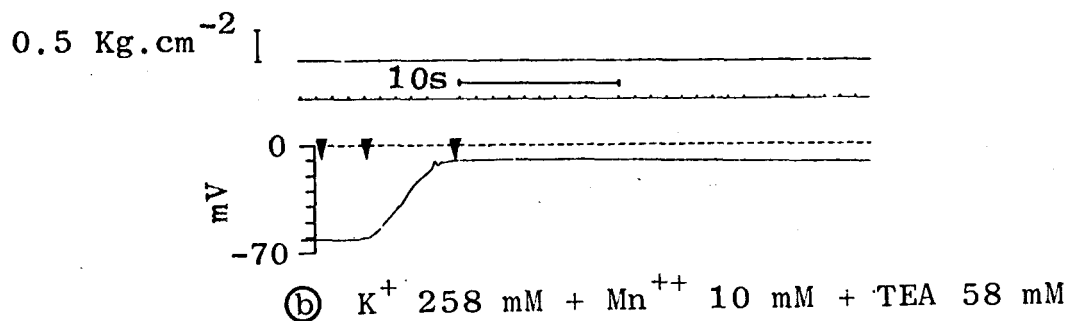
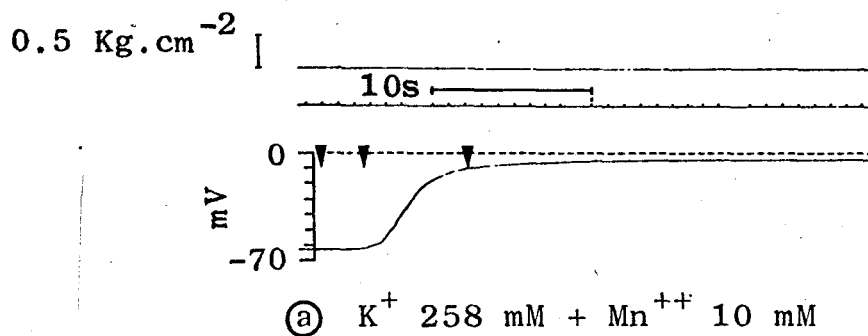
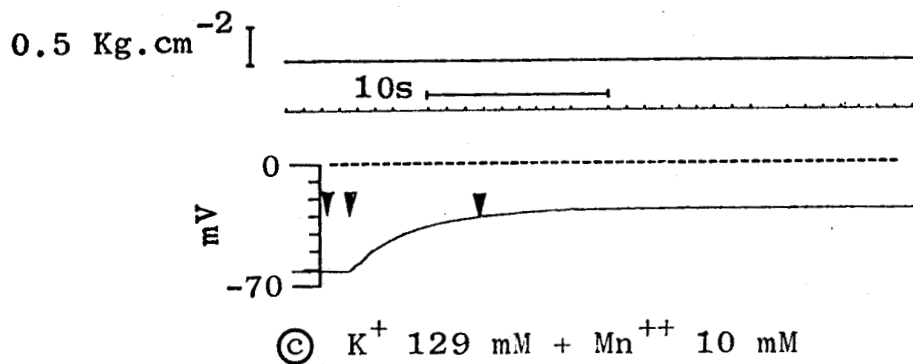
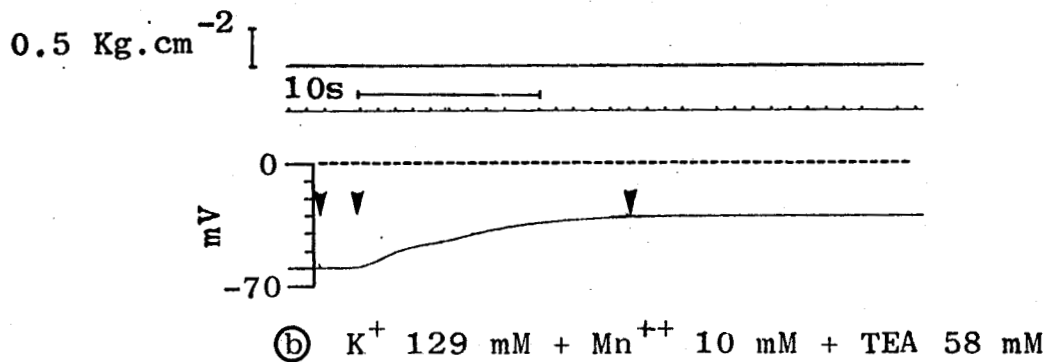
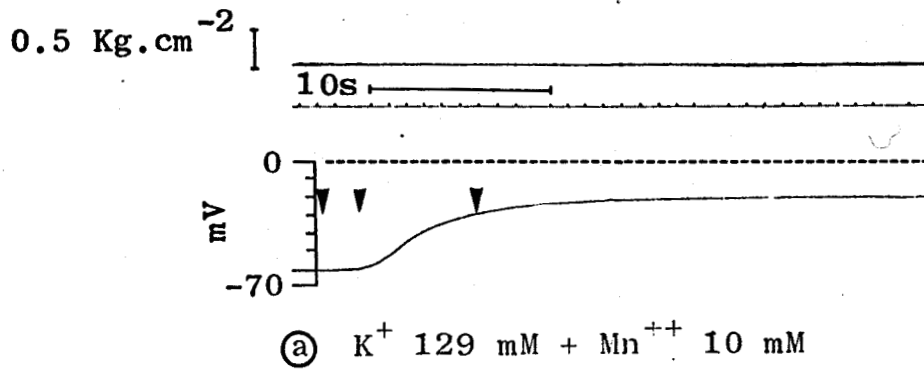


Figure 56

Effets du TEA (58 mM), à faible concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  (78 mM), en présence de  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM), sur la dépolarisation membranaire d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 258 mM) dans des conditions d'isotonie.

La concentration en ions du milieu de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8$  mM ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6$  mM ;  $\text{Na}^+ = 515,6$  mM ;  $\text{K}^+ = 12,9$  mM ; choline $^+$  = 58 mM ;  $\text{Mn}^{++} = 10$  mM ;  $\text{Cl}^- = 78$  mM ;  $\text{SO}_4^{--} = 30,05$  mM ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 536,6$  mM ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est réalisé en remplaçant  $\mu\text{M}$  à mM une partie des ions  $\text{Na}^+$  du milieu de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre par des ions  $\text{K}^+$ . Pour la solution contenant le TEA (b), l'apport de TEA est réalisé en remplaçant les ions choline $^+$  de la solution de référence initiale choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre, par les ions TEA $^+$ .

Pour chaque épreuve (a), (b) ou (c) : la trace du haut montre l'abolition de la contracture potassique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire : (a) - en conditions de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre après 30 minutes d'action du milieu ; (b) - après 20 minutes d'action du TEA, en présence de  $\text{Mn}^{++}$  en  $\text{Cl}^-$  pauvre ; (c) - après 20 minutes de retour aux conditions initiales de référence (a) (réversibilité). Les flèches indiquent le niveau de potentiel correspondant à -10 mV. La seconde flèche (sur chaque tracé) précise également l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée.



#### 4.4. Comparaison des effets du TEA sur la fibre musculaire de grenouille et sur celle de crabe. Conclusion

Ces résultats montrent que le TEA exerce un effet inverse selon qu'il s'agisse de la fibre musculaire de crabe ou de la fibre musculaire de grenouille. Si ces résultats peuvent se comprendre au niveau de la grenouille du fait de l'inhibition par le TEA du courant de K<sup>+</sup> passant par le canal de rectification retardée (STANFIELD, 1970), l'effet opposé du



### Figure 57

Effets du TEA (58 mM), à faible concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  (78 mM), en présence de  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM), sur la dépolarisation membranaire d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, produite par un accroissement soudain, mais moindre (par rapport à la fig. 56), de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 129 mM) dans des conditions d'isotonie.

La concentration en ions du milieu de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8$  mM ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6$  mM ;  $\text{Na}^+ = 515,6$  mM ;  $\text{K}^+ = 12,9$  mM ; choline $^+$  = 58 mM ;  $\text{Mn}^{++} = 10$  mM ;  $\text{Cl}^- = 78$  mM ;  $\text{SO}_4^{--} = 30,05$  mM ;  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^- = 536,6$  mM ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $\text{Na}^+$  du milieu de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre par des ions  $\text{K}^+$ . Pour la solution contenant le TEA (b), l'apport de TEA est réalisé en remplaçant les ions choline $^+$  de la solution de référence initiale choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  par les ions TEA $^+$ .

Pour chaque épreuve (a), (b) ou (c) : la trace du haut montre l'abolition de la contracture potassique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire : (a) - en conditions de référence choline,  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$  pauvre après 30 minutes d'action du milieu ; (b) - après 20 minutes d'action du TEA $^+$ , en présence de  $\text{Mn}^{++}$ , en  $\text{Cl}^-$  pauvre ; (c) - après 20 minutes de retour aux conditions initiales de référence (a) (réversibilité). Les flèches indiquent le niveau de potentiel correspondant à -30 mV. La seconde flèche (sur chaque tracé) précise également l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée.

TEA sur la fibre de crabe ne peut être interprété de la même façon. En présence d'une concentration extracellulaire de  $\text{Cl}^-$  normale, la dépolarisation plus ample provoquée par l'excès de  $\text{K}^+$  extracellulaire n'implique pas d'emblée que le TEA puisse agir sur une rectification de nature ionique autre que potassique. En effet, sur la fibre de crustacé, SUAREZ-KURTZ (1974) montre que le TEA augmenterait la conductance aux ions  $\text{Ca}^{++}$  qui portent en partie le courant entrant (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a ; MOUNIER et VASSORT, 1973). Cependant, les résultats décrits montrent qu'un courant entrant ne peut à lui seul expliquer l'augmentation de la dépolarisation en présence de TEA puisque la dépolarisation provoquée par l'excès de  $\text{K}^+$  est encore accrue en présence de  $\text{Mn}^{++}$ . D'autre

part, sur cette même préparation, MOUNIER et GUILBAULT (1970), HAUDECOEUR et GUILBAULT (1974) montrent que les phénomènes de rectification retardée sont supprimés en absence de  $\text{Cl}^-$  externe (les ions  $\text{Cl}^-$  remplacés par des anions imperméants : propionate ou méthylsulfate). Cette rectification retardée persiste, et est inhibée par le TEA, en présence seulement dans le milieu extracellulaire de chlorure de choline (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 ; BRULE et coll., 1976 ; HAUDECOEUR et coll., 1977). Dès lors, la nature autre que potassique de la rectification retardée peut être postulée. De plus, les résultats précédemment décrits montrent que les effets du TEA sur la dépolarisation induite par des milieux riches en  $\text{K}^+$  sont dépendants de la concentration externe en  $\text{Cl}^-$ . En effet, en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ , le TEA n'affecte plus l'évolution de la dépolarisation en milieu très riche en  $\text{K}^+$  (258 mM) alors qu'il diminue son amplitude et sa vitesse en milieu contenant seulement 129 mM de  $\text{K}^+$ . Ainsi, dans la mesure où la dépolarisation induite par l'excès de  $\text{K}^+$ , en milieu de concentration variée en  $\text{Cl}^-$ , n'est déclenchée qu'après un prétraitement de 20 minutes de la fibre de crabe dans le milieu de concentration en  $\text{K}^+$  normale mais pauvre en  $\text{Cl}^-$ , il peut être admis que la distribution du  $\text{Cl}^-$  selon l'équilibre de DONNAN (si elle existe) a pu se produire et qu'alors la valeur de  $E_{\text{Cl}}$  est de nouveau égale à celle du PM. Dans ces conditions, en admettant la distribution passive, en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ , le courant de fuite porté, entre autre, par les ions  $\text{Cl}^-$  doit nécessairement exercer un effet moindre sur la vitesse de dépolarisation. En effet, en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ , la résistance de membrane augmentant (MOUNIER et GUILBAULT, 1970 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974), la vitesse de dépolarisation avec 258 mM de  $\text{K}^+$  est sensiblement accrue et l'amplitude maintenue, le  $\text{Cl}^-$  aurait donc moins d'influence antagoniste sur le courant de  $\text{K}^+$  passant par le canal de rectification inhibé par le TEA. Cependant, cette hypothèse n'explique pas le résultat obtenu en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  et moins riche en  $\text{K}^+$  (129 mM) où la vitesse et l'amplitude de la dépolarisation sont diminuées en présence de TEA. Par contre, si l'on admet que le  $\text{Cl}^-$  n'est pas distribué passivement selon l'équilibre de DONNAN, l'ensemble des effets du TEA en fonction de la  $[\text{Cl}^-]_e$  peut être interprété. L'hypothèse de non distribution passive de  $\text{Cl}^-$  chez la fibre de crabe peut se concevoir dans la mesure où, chez des fibres excitables d'invertébrés, la distribution passive du  $\text{Cl}^-$  de part et d'autre de la membrane est loin d'être le cas général. De fait, sur la fibre musculaire de crabe, GOUBEL et GUILBAULT

(1972) montrent que la concentration intracellulaire de  $\text{Cl}^-$  n'est pas en accord avec une distribution de cet ion, selon l'équilibre de DONNAN. Sur la même préparation, MOUNIER (1970) montre, qu'en conditions d'état stable, la variation du potentiel de membrane en fonction du  $\log [\text{K}^+]_e$ , est plus ample en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  (le  $\text{Cl}^-$  étant remplacé par le propionate). De plus, HAUDECOEUR (1975) montre que l'appauvrissement en  $\text{Cl}^-$  extracellulaire (remplacement par du méthylsulfate, à 90 p. 100) conduit, tout comme sur la fibre de grenouille (HODGKIN et HOROWICZ, 1959) à une dépolarisation transitoire mais, sur la fibre de crabe, la repolarisation, est très incomplète. Si le  $\text{Cl}^-$  n'est pas distribué passivement, le potentiel d'équilibre de la pile au  $\text{Cl}^-$  voisin du potentiel de repos pour une  $[\text{Cl}^-]_e$  normale se trouverait déplacé dans le sens des dépolarisations d'une valeur de l'ordre de 50 mV en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  (78 mM). La nouvelle valeur de  $E_{\text{Cl}}$  serait proche de 0 mV quand la  $[\text{Cl}^-]_e$  passe de 652 à 78 mM. Si le TEA bloque le canal de rectification retardée par où passerait un courant de  $\text{Cl}^-$ , la dépolarisation membranaire induite par l'excès de  $\text{K}^+$  se trouverait ainsi accélérée en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  et serait plus ample qu'en milieu de  $[\text{Cl}^-]_e$  normale. En milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  ( $E_{\text{Cl}} \neq 0$ ) l'effet du TEA sur la dépolarisation membranaire induite par l'apport de  $\text{K}^+$  extracellulaire dépendrait de la différence de  $E_{\text{K}}$  par rapport à  $E_{\text{Cl}}$ . Avec 258 mM de  $\text{K}^+$  externe, ( $[\text{K}^+]_i \neq 130$  mM)  $E_{\text{K}}$  serait supérieur à  $E_{\text{Cl}}$  et ainsi le mouvement de  $\text{Cl}^-$  n'aurait que peu d'influence sur la dépolarisation alors qu'à l'inverse avec 129 mM de  $\text{K}^+$  externe,  $E_{\text{K}}$  serait plus proche de  $E_{\text{Cl}}$  et de ce fait, l'influence des mouvements du  $\text{Cl}^-$  se traduirait par des modifications de l'amplitude et de la vitesse de dépolarisation.

En conclusion, il apparaît que la rectification retardée, bloquée en partie par le TEA, semble être due à une modification de la conductance membranaire au  $\text{Cl}^-$  plutôt qu'à une variation de la conductance au  $\text{K}^+$ . Cette hypothèse s'accorde avec celle de GIRARDIER et coll. (1963) concernant la possible existence d'un courant dynamique de  $\text{Cl}^-$  dans la membrane tubulaire de la fibre musculaire d'écrevisse. De plus, l'existence de ce courant sortant porté pour une grande part par les ions  $\text{Cl}^-$  est démontrée sur la fibre de crabe par HAUDECOEUR et coll. (1977).

Compte-tenu des premiers résultats acquis en ce qui concerne la contracture potassique au niveau de la fibre musculaire de crabe, il apparaît d'une part que l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  est nécessaire au déclenchement de la

contracture potassique, que d'autre part, en absence de  $\text{Na}^+$  dans le milieu extracellulaire, l'importance de la valeur de  $E_K$  intervient en ce sens que l'effet de l'entrée de  $\text{K}^+$ , sous la dépendance de la "driving force" des ions  $\text{K}^+$ , modifiant  $[\text{K}^+]_i$  retentit sur la contraction propre des myofilaments (chapitre III). Cette hypothèse permet ainsi d'expliquer les niveaux de tension atteints, d'autant plus que l'entrée accrue de  $\text{Ca}^{++}$ , en absence de  $\text{Na}^+$  extracellulaire, serait elle-même compensée par une libération moindre du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S.

Aussi, à ce stade des résultats et des hypothèses, il importait de compléter l'expérimentation et notamment de voir l'importance de la composante contractile due à la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. Ainsi, de façon à analyser plus en détail, le couplage excitation-contraction vont maintenant être décrits les résultats concernant l'importance de l'environnement anionique extracellulaire avec variation des concentrations des cations.

5 - Influence de la concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  sur la contracture potassique et le potentiel de membrane de la fibre isolée en présence de concentrations variées en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$

Le maintien du  $\text{Cl}^-$  à l'intérieur de la fibre est extrêmement important pour l'évolution de la tension mécanique, il est montré en effet (chapitre III) que la suppression du  $\text{Cl}^-$  au niveau des myofilaments aboutit à un développement de tension beaucoup plus faible. Si la distribution passive de  $\text{Cl}^-$  existait au niveau de la fibre de crabe, l'absence totale de  $\text{Cl}^-$  dans le milieu externe devrait avoir un effet tel que la contracture serait considérablement réduite. L'importance du  $\text{Cl}^-$  est également notée au niveau des fibres pelées par COSTANTIN et PODOLSKY (1967) qui constatent que de hautes concentrations en  $\text{Cl}^-$  dans l'espace myofilamentaire accroissent l'efflux de  $\text{Ca}^{++}$  du reticulum sarcoplasmique. De même sur les fibres pelées en présence de peu de  $\text{Mg}^{++}$ , le  $\text{Cl}^-$  stimule une libération rapide de  $\text{Ca}^+$  du reticulum sarcoplasmique, en quantité suffisante pour déclencher une réponse mécanique (STEPHENSON et PODOLSKY, 1977 b). Enfin, au niveau de fibres intactes, l'application de milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  provoque une dépolarisation qui peut entraîner le dévelop-

pement d'une contracture (HODGKIN et HOROWICZ, 1959). Sur la fibre musculaire de crabe, l'application d'un milieu ne renfermant que 83,7 mM de  $\text{Cl}^-$ , amène transitoirement et rapidement le potentiel de membrane à une valeur de - 42 mV en moyenne (MOUNIER, 1970).

### 5.1. Influence de la concentration extracellulaire en $\text{Cl}^-$

Pour l'enregistrement de la contracture, la concentration initiale choisie amène le potentiel de membrane à des valeurs telles que certaines fibres sont à la limite du seuil d'activation ce qui explique que certaines fibres vont se contracter au cours du prétraitement en milieu  $\text{Cl}^- = 83,7$  mEq (dans ces milieux, le  $\text{Cl}^-$  manquant est remplacé mM à mM par du méthylsulfate). Dans de telles conditions, sur 8 fibres testées, 3 vont présenter des réponses mécaniques avant l'application du milieu hyperpotassique. Pour cette série d'expériences, les fibres sont placées pendant 10 minutes en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  avant d'être soumises à l'action du milieu enrichi en  $\text{K}^+$  mais pauvre en  $\text{Cl}^-$  (l'apport de  $\text{K}^+$  est réalisé sous forme de méthylsulfate). La figure 58 donne un exemple de contracture obtenue lors de l'application du milieu riche en  $\text{K}^+$  (20 fois la concentration extracellulaire normale : 258 mM) après passage en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ . La tension moyenne de contracture ainsi obtenue est de  $3,26 \pm 0,21 \text{ Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 5$ ). Il est possible, dans de telles conditions expérimentales, de voir que la réduction du  $\text{Cl}^-$  extracellulaire renforce la contracture, tout comme par ailleurs le TEA qui agit sur les mouvements de  $\text{Cl}^-$  ainsi que cela vient d'être montré.

De manière à approfondir l'importance de l'environnement en  $\text{Cl}^-$  extracellulaire sur la tension de contracture, la concentration extracellulaire de  $\text{Cl}^-$  a cette fois été réduite à 0. Il est toutefois difficile dans ces nouvelles conditions de prétraiter les fibres en milieu dépourvu d'ions  $\text{Cl}^-$  avant de les soumettre à l'action du même milieu enrichi en  $\text{K}^+$ . En effet, la seule application du milieu sans  $\text{Cl}^-$  amène le potentiel de membrane à une valeur bien moins négative que celle correspondant au seuil d'activation mécanique et favorise le déclenchement d'activités spontanées qui empêcheront le développement d'une contracture ultérieure normale. Afin cependant de pouvoir étudier l'influence d'une forte réduction du  $\text{Cl}^-$  extracellulaire sur ces préparations, un prétraitement préalable de

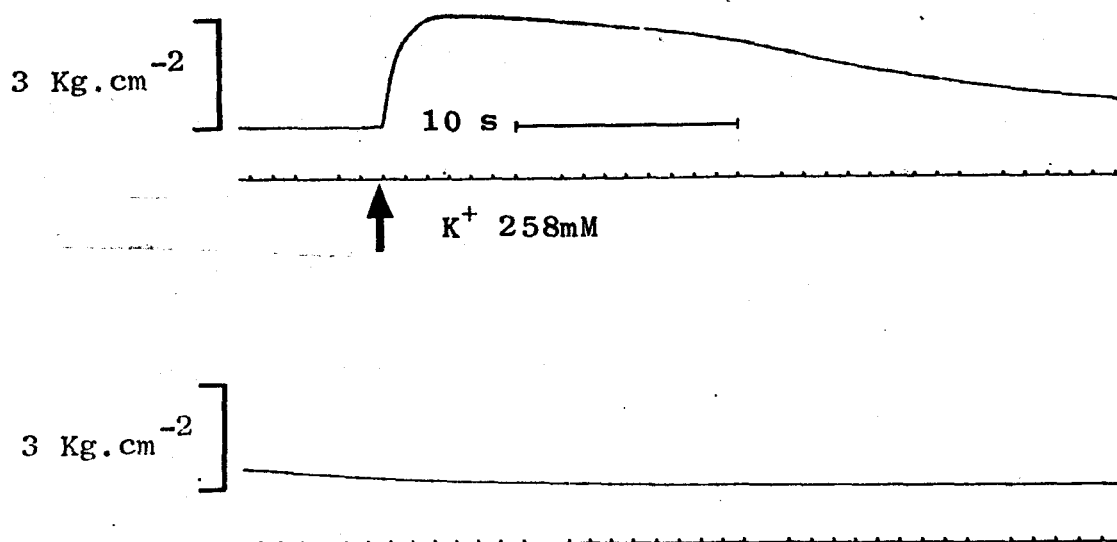


Figure 58

Contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 258 mM) à faible concentration extracellulaire en  $Cl^-$  (83,7 mM) dans des conditions d'isotonie.

La concentration en ions du milieu de référence pauvre en  $Cl^-$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Cl^- = 83,7$  mM ;  $CH_3OSO_3^- = 513$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mm à mm une partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence pauvre en  $Cl^-$  par des ions  $K^+$ . La contracture est obtenue après un prétraitement de la fibre pendant 10 minutes dans le milieu de référence pauvre en  $Cl^-$ . Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre le développement de la contracture ; la trace du bas donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde). La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée.

20 minutes des fibres en milieu de référence additionné de 10 mM de  $Mn^{++}$  est effectué. La fibre est ensuite baignée pendant 15 minutes [temps suffisant pour atteindre un état stable (MOUNIER et GUILBAULT, 1970 ; GOUBEL, 1973 ; BRULE et coll., 1976)] dans le milieu de référence où le chlorure de sodium est remplacé par du méthylsulfate de  $Na^+$ , et où les autres anions utilisés sont : le propionate et le sulfate. L'addition à cette solution de 10 mM de chlorure de  $Mn^{++}$  amène donc une concentration finale de  $Cl^-$  égale à 20 mM. Dans de telles conditions, la figure 59 (tracé du

haut) montre que, dans un premier temps, le potentiel de membrane est amené au cours du prétraitement à la valeur de  $-57$  mV après 15 minutes. Sur l'ensemble des manipulations ( $n = 5$ ) le PR égal à  $-67,0 \pm 3,9$  mV, dans les conditions normales, passe au maximum à  $-51,8 \pm 4,3$  mV, et revient au bout de 15 minutes de prétraitement à une valeur de  $-57,0 \pm 2,7$  mV. Ainsi, la présence du  $Mn^{++}$  au niveau de la préparation avant l'application du milieu très pauvre en  $Cl^{-}$  supprime la phase rapide de dépolarisation observée par GOUBEL (1973) sur cette même préparation. L'application du milieu hyperpotassique (20 fois la concentration extracellulaire normale) consécutive au traitement en milieu pauvre en  $Cl^{-}$  permet, ainsi que l'atteste la figure 59, le développement, malgré la présence de  $Mn^{++}$ , d'une contracture d'une amplitude variable selon les fibres. La tension moyenne atteinte est de  $2,00 \pm 0,80$  Kg.cm<sup>-2</sup> ( $n = 5$ ) ; au cours du développement de cette tension, le potentiel de membrane évolue vers le 0 de potentiel (en moyenne  $-1 \pm 1$  mV). De plus, sur certaines fibres, apparaît au niveau du décours du potentiel de membrane une activité spontanée pour des valeurs de potentiel voisine de  $-30$  mV témoignant de l'existence d'un courant entrant en dépit de la présence d'ions  $Mn^{++}$ . D'autre part, il faut signaler que le phénomène mécanique que constitue la contracture se développe beaucoup plus lentement que dans les conditions normales (absence de  $Mn^{++}$ ) et que la tension moyenne est plus faible. Comme cette contracture persiste malgré la présence de  $Mn^{++}$ , il peut alors se faire que la concentration de  $Mn^{++}$  soit insuffisante pour bloquer la totalité du courant entrant calcique (la fig. 59 révèle l'activité spontanée). Toutefois, un prétraitement de la fibre de crabe par un milieu contenant 20 mM de  $MnCl_2$  ne supprime pas davantage le phénomène mécanique, ni la présence, dans certains cas, au début de la dépolarisation, d'une activité électrique répétitive. De fait, la figure 60 montre l'évolution du potentiel de membrane ainsi que l'enregistrement d'une contracture qui se développe consécutivement à l'application du milieu hyperpotassique (20 fois la concentration extracellulaire normale). L'action de ce milieu fait suite à un prétraitement de la fibre pendant 20 minutes dans le liquide physiologique de référence additionné de 20 mM de  $MnCl_2$ , suivi d'un passage de 15 minutes en milieu pauvre en  $Cl^{-}$  additionné de  $Mn^{++}$  (ce dernier milieu renferme 40 mM de  $Cl^{-}$ ). L'application du milieu hyperpotassique permet là encore le développement d'une contracture relativement importante ( $2,07 \pm 0,53$  Kg.cm<sup>-2</sup> ;  $n = 4$ ) qui s'établit lentement, tout comme



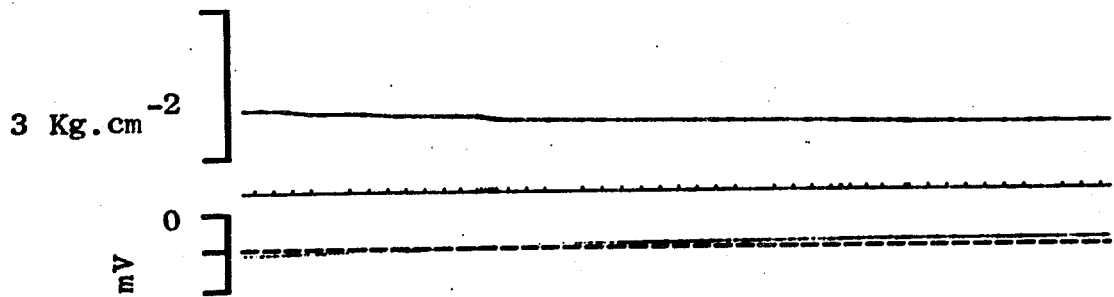
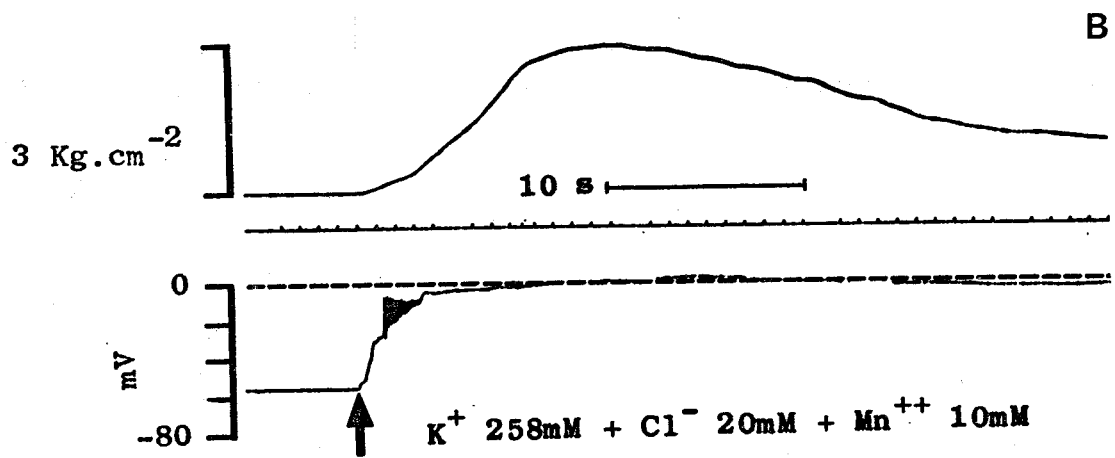
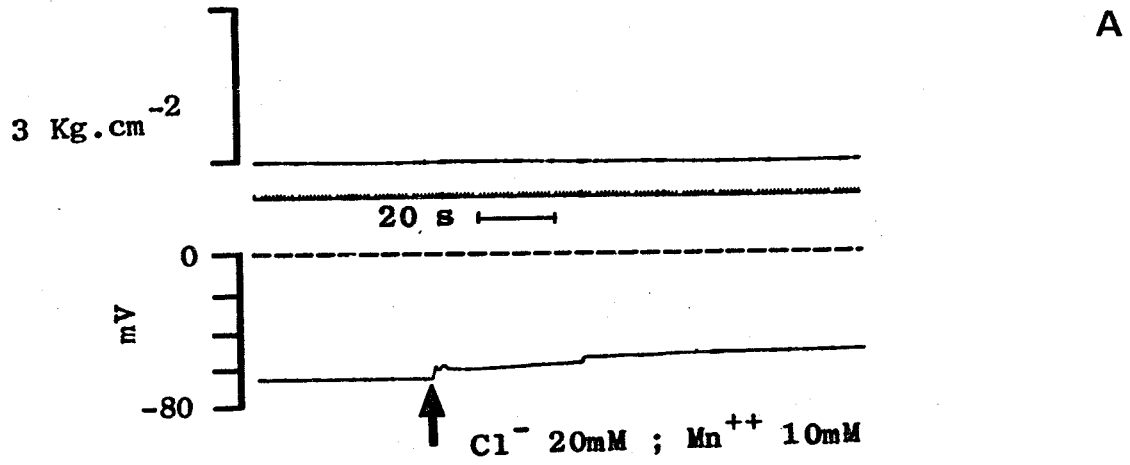


Figure 59

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 258 mM), en présence de  $Mn^{++}$  (10 mM) à faible concentration extracellulaire en  $Cl^-$  (20 mM).

La concentration en ions du milieu de référence  $Mn^{++}$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ;  $Cl^- = 616,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. La réduction de la concentration en  $Cl^-$  est obtenue en remplaçant 596,7 mM de  $Cl^-$  par :  $CH_3OSO_3^- = 525,9$  mM ;  $SO_4^{--} = 23,6$  mM et  $CH_3CH_2COO^- = 23,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $Na^+$  de ce dernier milieu par des ions  $K^+$ .

Pour chaque épreuve : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec une absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire.

Le tracé A montre l'évolution du potentiel de membrane lors de l'application du milieu pauvre en  $Cl^-$  (20 mM) en présence de  $Mn^{++}$  (10 mM) après 20 minutes d'action du milieu de référence  $Mn^{++}$  (10 mM). La flèche précise l'instant où le milieu pauvre en  $Cl^-$  est appliqué à la fibre.

Le tracé B, présenté en deux parties, montre l'évolution de la contracture et de la dépolarisation membranaire consécutive à l'accroissement soudain (flèche) de la concentration extracellulaire en  $K^+$ , après 15 minutes de prétraitement de la fibre en milieu pauvre en  $Cl^-$  (20 mM) et en présence de  $Mn^{++}$  (10 mM).

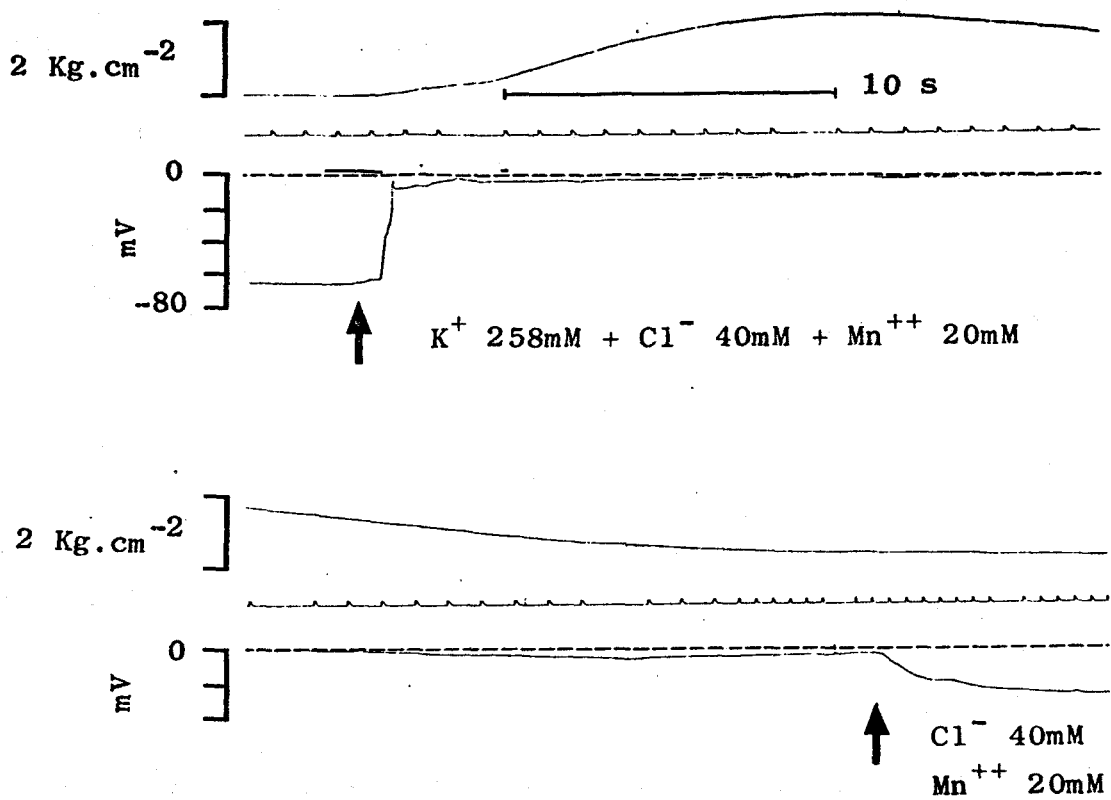


Figure 60

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de K<sup>+</sup> (de 12,9 à 258 mM), en présence de Mn<sup>++</sup> (20 mM) à faible concentration extracellulaire en Cl<sup>-</sup> (40 mM).

La concentration en ions du milieu de référence Mn<sup>++</sup> est : Ca<sup>++</sup> = 11,8 mM ; Mg<sup>++</sup> = 23,6 mM ; Na<sup>+</sup> = 515,6 mM ; K<sup>+</sup> = 12,9 mM ; Mn<sup>++</sup> = 20 mM ; Cl<sup>-</sup> = 636,7 mM ; CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup> = 2,6 mM. La réduction de la concentration en Cl<sup>-</sup> est obtenue en remplaçant 596,7 mM de Cl<sup>-</sup> par CH<sub>3</sub>O SO<sub>3</sub><sup>-</sup> = 525,9 mM ; SO<sub>4</sub><sup>-</sup> = 23,6 mM ; CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup> = 23,6 mM. L'accroissement de la concentration en K<sup>+</sup> est alors réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions Na<sup>+</sup> de ce dernier milieu par des ions K<sup>+</sup>.

Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contraction ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec une absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La première flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en K<sup>+</sup> est soudainement augmentée, après 15 minutes de prétraitement de la fibre en milieu pauvre en Cl<sup>-</sup> (40 mM) et en présence de Mn<sup>++</sup> (20 mM) qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 20 minutes dans le milieu de référence Mn<sup>++</sup> (20 mM). La seconde flèche précise le retour au milieu pauvre en Cl<sup>-</sup> (40 mM), en présence de Mn<sup>++</sup> (20 mM), de concentration extracellulaire en K<sup>+</sup> normale (12,9 mM).

avec seulement 10 mM de  $Mn^{++}$  (il est à noter qu'une fibre sur 5 testées n'a pas développé de contracture). Le potentiel de membrane évolue là encore vers le 0 de potentiel et atteint une valeur moyenne de  $+1 \pm 1,4$  mV ( $n = 5$ ). Le développement d'une contracture potassique malgré la présence de  $Mn^{++}$  même à des concentrations importantes (20 mM) peut laisser supposer l'existence d'une autre composante de courant entrant, comme le témoigne le point d'inflexion dans la phase ascendante de la dépolarisation (Fig. 60) et qui ne serait pas bloquée par le  $Mn^{++}$  comme l'est la composante calcique précoce. Il pourrait de ce fait y avoir deux composantes de courant entrant. L'existence de ces composantes sera d'ailleurs précisée ultérieurement. Cependant, dès à présent, il est évident que l'absence de  $Cl^-$  dans le milieu externe n'empêche pas le développement de la contracture lorsque ce  $Cl^-$  est remplacé par le méthylsulfate (anion imperméant) ainsi que cela vient d'être décrit, alors que la même substitution au niveau des myofilaments entraîne le développement d'une tension mécanique beaucoup plus faible, ce qui plaide de nouveau en faveur d'un maintien de la concentration interne de  $Cl^-$  et donc d'une distribution non passive de cet ion. En présence d'inhibiteurs du métabolisme (2,4 Dinitrophénol et ouabaïne), GOUBEL et GUILBAULT (1972), GOUBEL (1973) montrent sur la même préparation que l'activité du  $Cl^-$  intracellulaire varie consécutivement à la dépolarisation membranaire produite par un accroissement de la concentration externe de  $K^+$  alors qu'en leur absence cette activité est maintenue constante.

Dans la mesure où le  $Mn^{++}$  n'exerce aucun effet supplémentaire pour des concentrations plus élevées, pour la suite des expériences, la concentration de 10 mM sera conservée afin de maintenir la concentration extracellulaire de  $Cl^-$  la plus basse possible.

### 5.2. Influence de l'ion $Na^+$ en milieu pauvre en $Cl^-$

En plus de l'appauvrissement en  $Cl^-$ , va maintenant être testée la suppression du  $Na^+$  externe qui, rappelons-le, en présence de  $Cl^-$  permet l'obtention d'une contracture maximale pour un enrichissement moindre de  $K^+$  (Fig. 47). La fibre est ici prétraitée 20 minutes en solution de référence additionnée de 10 mM de  $Mn^{++}$ , puis 15 minutes en milieu

dépourvu de  $\text{Na}^+$ , pauvre en  $\text{Cl}^-$  (20 mM) et renfermant toujours 10 mM de  $\text{Mn}^{++}$ . La pression osmotique d'un tel milieu est maintenue à la valeur de référence par apport convenable de saccharose. La figure 61 montre l'évolution du potentiel de membrane lorsque la fibre baigne dans un tel milieu. La valeur moyenne du PR mesuré dans les conditions de référence ( $-66,8 \pm 0,9$  mV ;  $n = 5$ ), pour les fibres testées, passe à  $-42 \pm 5$  mV pour revenir après 15 minutes à  $-58,2 \pm 4,5$  mV. La dépolarisation plus importante, par rapport à celle observée en présence de  $\text{Na}^+$ , obtenue par l'application de ce milieu, peut résulter, non seulement de l'absence de

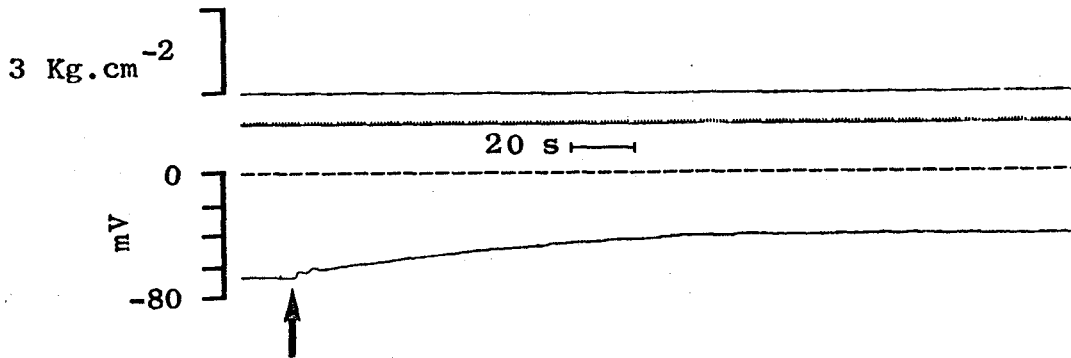


Figure 61

Dépolarisation membranaire d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produite par l'absence de  $\text{Na}^+$  extracellulaire (reste 2,6 mM sous forme de  $\text{CO}_3\text{H}^- \text{Na}^+$ ) à faible concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  (20 mM) en présence de  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM).

La concentration en ions du milieu de référence  $\text{Mn}^{++}$  est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8$  mM ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6$  mM ;  $\text{Na}^+ = 515,6$  mM ;  $\text{K}^+ = 12,9$  mM ;  $\text{Mn}^{++} = 10$  mM ;  $\text{Cl}^- = 616,7$  mM ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6$  mM. La suppression et la réduction des concentrations respectives en  $\text{Na}^+$  et en  $\text{Cl}^-$  est réalisée par la suppression du NaCl et l'apport du  $\text{K}^+$  et du  $\text{Mg}^{++}$  sous forme de  $\text{SO}_4^{--}$ , du  $\text{Ca}^{++}$  sous forme de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ . La pression osmotique d'un tel milieu est ajustée à celle du milieu de référence par apport de 1026 mM de saccharose.

Pour l'enregistrement : la trace du haut révèle l'absence de développement de tension mécanique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre la dépolarisation membranaire consécutive à l'application du milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  ; sans  $\text{Na}^+$  en présence de  $\text{Mn}^{++}$  (flèche) après un prétraitement de la fibre de 20 minutes en milieu de référence  $\text{Mn}^{++}$ .

$\text{Cl}^-$ , mais également de la présence de saccharose, car il est maintenant connu qu'au niveau de cette préparation, il est préférable d'utiliser l'urée plutôt que le saccharose (BRULE et coll., 1977 a ; DELORME et coll., 1978). Toutefois, l'application d'un tel milieu riche en  $\text{K}^+$  (20 fois la concentration extracellulaire normale) sur de telles fibres pré-traitées en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  et en absence de  $\text{Na}^+$ , permet là encore le développement d'une contracture importante qui s'établit lentement. Le décours du potentiel de membrane est modifié par rapport au milieu renfermant du  $\text{Na}^+$  ainsi que l'atteste la figure 62. La dépolarisation s'établit également lentement et atteint un potentiel très légèrement positif puisque la valeur est de  $+4 \pm 3,6$  mV ( $n = 5$ ). La tension moyenne de contracture développée dans de telles conditions est de  $2,60 \pm 0,50$   $\text{Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 5$ ). Toutefois, en ce qui concerne l'action de ce milieu, il faut préciser que la suppression de tout le sodium extracellulaire a modifié notablement la force ionique et donc l'activité des ions, notamment du  $\text{Ca}^{++}$ , comparativement à celle du milieu de référence. C'est ainsi que si l'activité du  $\text{Ca}^{++}$  est, en milieu de référence, de  $2,83.10^{-3}$  M, elle se trouve beaucoup plus forte dans ce milieu sans  $\text{Na}^{++}$  et pauvre en  $\text{Cl}^-$  puisque d'une valeur égale à  $4,06.10^{-3}$  M. De même, lors de l'application de ce milieu enrichi en  $\text{K}^+$ , l'activité du  $\text{Ca}^{++}$  reste supérieure, elle est de  $3,26.10^{-3}$  M. La tension légèrement plus forte observée en absence de  $\text{Na}^+$ , en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$ , ( $2,6$   $\text{Kg.cm}^{-2}$ ) peut donc résulter d'une activité plus forte du  $\text{Ca}^{++}$ .

La suppression du  $\text{Cl}^-$  et du  $\text{Na}^+$  extracellulaires en présence de  $\text{Mn}^{++}$  permet donc le développement d'une contracture potassique ; aussi, la deuxième composante de courant entrant, dont l'existence a été pressentie par HAUDECOEUR (1975), dans des conditions de potentiel imposé, pourrait éventuellement être portée par des ions  $\text{Ca}^{++}$  seuls ou couplés à d'autres ions qui passeraient par un canal insensible au  $\text{Mn}^{++}$ . Si tel était le cas, la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  du milieu extracellulaire devrait empêcher le développement de la contracture dans la mesure où l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  pourrait être le maillon indispensable à la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S.

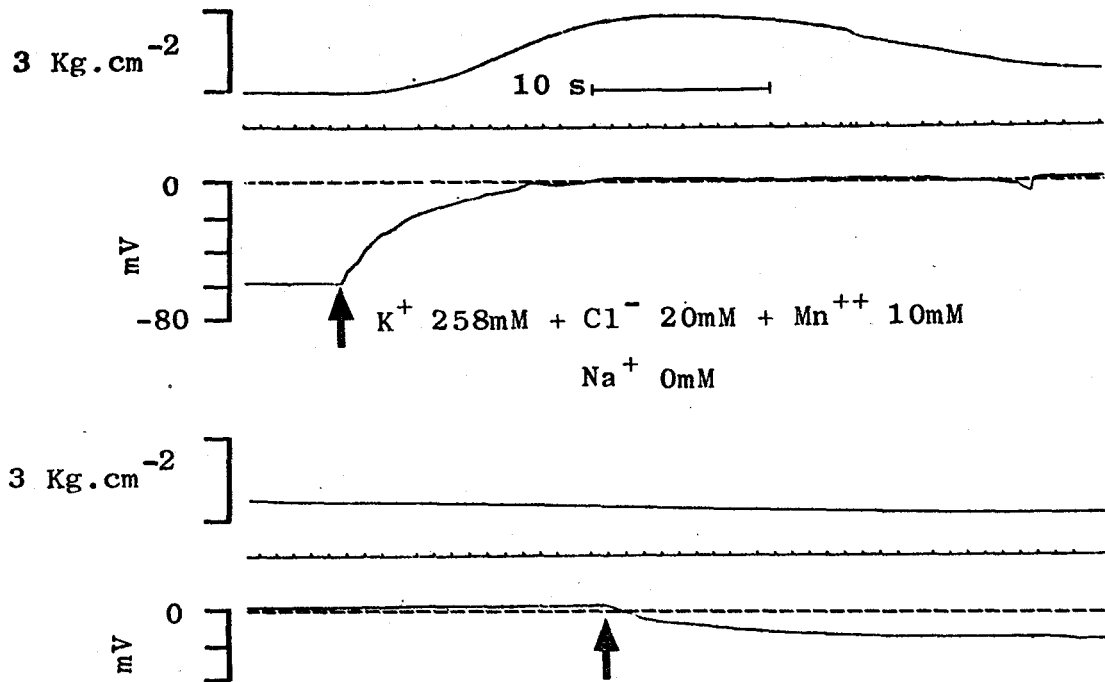


Figure 62

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 mM à 258 mM), en présence de  $Mn^{++}$  (10 mM) à faible concentration extracellulaire, en  $Cl^-$  (20 mM) en absence de  $Na^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $CO_3H^-Na^+$ ).

La concentration du milieu de référence  $Mn^{++}$  sans  $Na^+$ , pauvre en  $Cl^-$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 2,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ;  $Cl^- = 20$  mM ;  $SO_4^{--} = 30,05$  mM ;  $CH_3CH_2COO^- = 23,6$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM ; saccharose = 1026 mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est alors réalisé par apport de  $CH_3O SO_3^-K^+$  et suppression convenable de saccharose au milieu de référence  $Mn^{++}$ , sans  $Na^+$ , pauvre en  $Cl^-$  de façon à maintenir l'isotonie.

Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La première flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée, après 15 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $Mn^{++}$ , sans  $Na^+$ , pauvre en  $Cl^-$  qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 20 minutes en milieu normal contenant du  $Mn^{++}$  (voir figure 61). La seconde flèche précise le retour au milieu de référence  $Mn^{++}$ , sans  $Na^+$  et pauvre en  $Cl^-$ .



### 5.3. Influence de l'absence de $\text{Ca}^{++}$ en milieu pauvre en $\text{Cl}^-$

Les fibres testées dans ce cas sont prétraitées comme précédemment pendant 20 minutes en solution de référence additionnée de  $\text{Mn}^{++}$ , puis pendant 15 minutes par le milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  (20 mM) duquel le  $\text{Ca}^{++}$  est supprimé. Ce dernier milieu renferme bien évidemment 10 mM de  $\text{Mn}^{++}$ . Au cours de l'application d'un tel milieu, le potentiel de membrane évolue vers des dépolarisations moins importantes puisque de  $-74,2 \pm 0,6$  mV en milieu de référence, il passe à  $-56,2 \pm 8,9$  mV avant de revenir après 15 minutes à  $-58,5 \pm 6$  mV ( $n = 5$ ). Pour ces solutions, il n'a pas été nécessaire d'apporter de saccharose comme dans le cas de la solution précédente ( $\text{Cl}^- = 20$  mM ;  $\text{Na}^+ = 0$ ). Après ces prétraitements de la fibre, l'application du milieu sans  $\text{Ca}^{++}$ , pauvre en  $\text{Cl}^-$ , mais riche en  $\text{K}^+$  (20 fois la concentration de référence, soit 258 mM), entraîne une dépolarisation qui atteint un niveau maximal de  $-8 \pm 5,3$  mV ( $n = 5$ ), sans pour autant déclencher le phénomène mécanique ainsi que l'atteste la figure 63. Il faut de plus préciser que pour 2 fibres sur 5, une très faible activité spontanée est apparue au niveau du potentiel de membrane lorsque celui-ci a atteint des valeurs de  $-24$  et  $-30$  mV ; ces spikes ont toutefois une amplitude très faible (3 à 6 mV) comparés à ceux observés précédemment en présence de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Ca}^{++}$  (Fig. 59). L'existence de ces spikes, du fait de la présence de  $\text{Mn}^{++}$  et de l'absence de  $\text{Ca}^{++}$ , laisse à penser qu'ils pourraient être de nature sodique.

La suppression des ions  $\text{Ca}^{++}$  du milieu externe supprime tout phénomène mécanique, ce qui laisse à penser que, dans les conditions normales, l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  est une étape indispensable dans le couplage excitation-contraction.

Toutefois, il est possible de déclencher une contracture potassique, en présence de  $\text{Mn}^{++}$  et de  $\text{Ca}^{++}$ , bien que de décours plus lent en absence de  $\text{Cl}^-$  ou pour une concentration extrêmement réduite (20 mM). La présence même de  $\text{Mn}^{++}$  laisse supposer l'existence d'une seconde composante au courant entrant, insensible à cet ion ; de plus, la présence du phénomène mécanique plaide en faveur d'une distribution non passive du  $\text{Cl}^-$  dans la mesure où l'absence de  $\text{Cl}^-$  au contact des myofilaments réduit considérablement leur tension de contraction (chapitre III). En milieu pauvre en

$\text{Cl}^-$  (concentrations: 78 ; 40 ou 20 mM ), le développement d'une contracture est possible dans la mesure où un courant entrant, sous l'influence de la dépolarisation due à l'excès de  $\text{K}^+$  externe, apparaît. Avec 78 mM de  $\text{Cl}^-$ , la figure 56 ne révélait pas de point d'inflexion dans la phase initiale de la dépolarisation membranaire, ce qui se traduisait par une absence de contracture alors que pour 40 mM et 20 mM de  $\text{Cl}^-$  (Figs 59 et 60), il existe

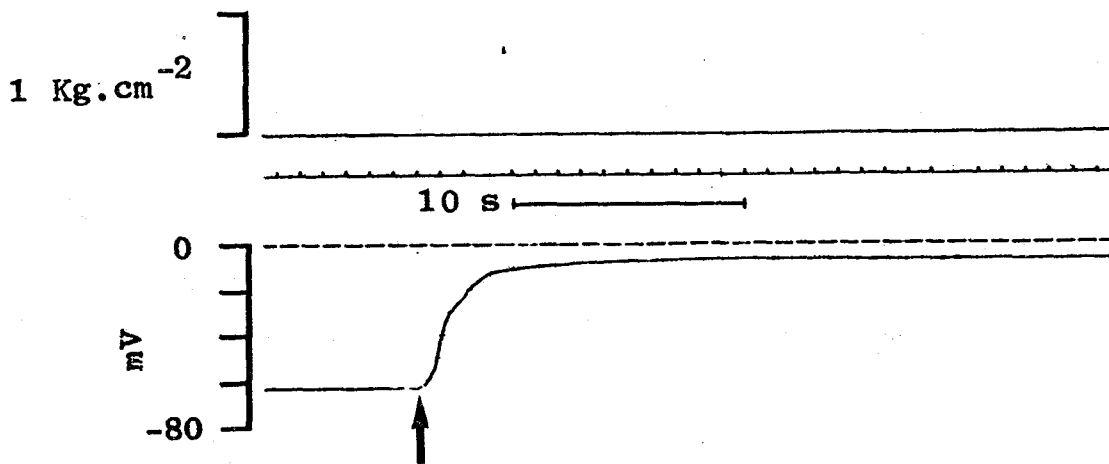


Figure 63

Dépolarisation membranaire (sans développement de contracture) d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 mM à 258 mM), en présence de  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM) à faible concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  (20 mM) en absence de  $\text{Ca}^{++}$ .

La concentration du premier milieu de prétraitement (pendant 20 minutes) est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8$  mM ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6$  mM ;  $\text{Na}^+ = 515,6$  mM ;  $\text{K}^+ = 12,9$  mM ;  $\text{Mn}^{++} = 10$  mM ;  $\text{Cl}^- = 616,7$  mM ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6$  mM. Celle du 2ème correspond par rapport au 1er à la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  et à la réduction du  $\text{Cl}^-$  (de 616,7 à 20 mM) avec comme anions de remplacement :  $\text{SO}_4^{--} = 30,05$  mM ;  $\text{CH}_3\text{O SO}_3^- = 513$  mM (agissant pendant 15 minutes). L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  de ce dernier milieu est alors réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $\text{Na}^+$  par des ions  $\text{K}^+$ .

Pour l'enregistrement : la trace du haut révèle l'absence de développement de tension mécanique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée.

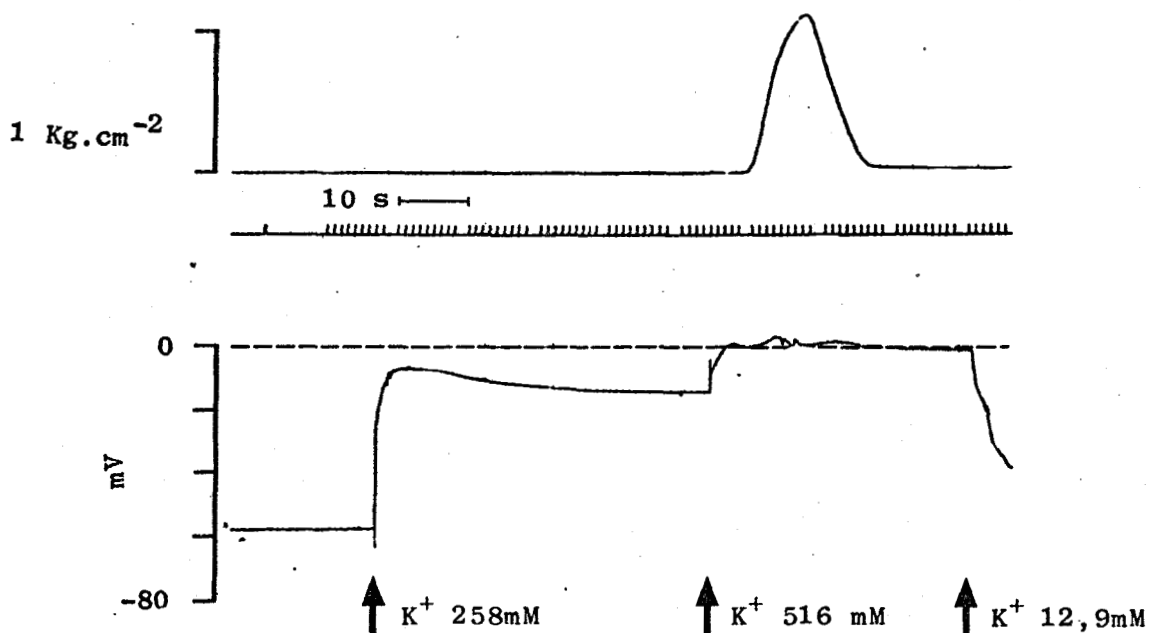
dans la phase de dépolarisation un point d'inflexion témoignant vraisemblablement d'une activation de conductance responsable d'un courant entrant de  $\text{Ca}^{++}$  à l'origine de la genèse de la contracture. Toutefois, pour ce type d'expérimentation, le  $\text{Cl}^-$  a été remplacé par un anion imperméant. Aussi, compte-tenu des résultats acquis, tant au niveau de l'activité ATPasique, qu'au niveau de la contraction des myofilaments concernant l'anion nitrate, considéré au niveau de la fibre comme un anion perméant, il importait maintenant de voir les effets de cet anion sur le développement de la contracture potassique.

#### 5.4. Influence de la substitution du $\text{Cl}^-$ par le $\text{NO}_3^-$

Le nitrate est l'un des anions testés par CARVALHO (1968), au niveau de la fraction microsomale de muscle squelettique de lapin, qui montre que cet anion, potentiateur de la contraction musculaire, inhibe la prise active et augmente la liaison passive du  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. isolé. De même, SLAVIČEK (1976 a) montre, sur le ventricule de rat, que si le  $\text{Cl}^-$  est remplacé par le nitrate ou le sulfate, la contracture est beaucoup plus faible qu'en milieu  $\text{Cl}^-$  (voir SLAVIČEK, 1976 b). Il est important de signaler qu'un anion perméant ou imperméant aboutit au même résultat. D'autre part, au niveau des fibres musculaires de semi-tendineux de grenouille, HODGKIN et HOROWICZ (1960 b) montrent que le remplacement du  $\text{Cl}^-$  par du nitrate réduit la quantité de  $\text{K}^+$  en excès nécessaire pour provoquer la contracture potassique. Ainsi, une préparation baignée par une solution renfermant 20 mM de  $\text{K}^+$  ne développe aucune tension mécanique, mais la seule substitution du  $\text{Cl}^-$  par le nitrate provoque le déclenchement d'une contracture. La présence de nitrate à la place du chlore réduit la concentration de  $\text{K}^+$  nécessaire pour l'obtention d'une tension mécanique donnée par environ un facteur de 2. Par contre, au niveau de la fibre musculaire de crabe, ATWOOD (1968) indique que les deux types de secousses, lentes et rapides, sont diminuées en nitrate. De même, la contracture potassique se trouve déprimée en présence de nitrate. Cet effet inhibiteur du nitrate sur la contracture potassique est, pour cet auteur, dû en grande partie à l'hyperpolarisation membranaire observée en présence de nitrate.

Pour ce qui est des résultats qui vont être présentés ci-après,

un prétraitement préalable des fibres musculaires est effectué en présence de nitrate (remplacement total du  $\text{Cl}^-$  par le nitrate) pendant 20 minutes. Ce prétraitement aboutit à une hyperpolarisation modérée (quelques mV) comme l'a montré HAUDECOEUR (1975). Si après ce traitement, la fibre est soumise à l'action d'un milieu enrichi en  $\text{K}^+$  (20 fois la concentration extracellulaire normale), aucune tension n'est alors développée, en dépit d'une vitesse de dépolarisation accrue par rapport à celle observée en présence de  $\text{Cl}^-$ . Toutefois, un enrichissement plus important de  $\text{K}^+$  (40 fois la normale) aboutit au développement d'une contracture potassique ainsi que le montre la figure 64. Pour l'action de ce milieu (enrichi 40 fois en  $\text{K}^+$ ) il n'a été testé que 3 fibres qui ont toutes trois donné des résultats différents ainsi que le montrent les figures 64, 65 et 66. Cependant, pour l'ensemble, la dépolarisation consécutive à l'application de ce milieu atteint le 0 de potentiel, et permet l'établissement de la contracture. La disparition du phénomène mécanique lors de l'application d'un milieu enrichi seulement 20 fois en  $\text{K}^+$ , laisse à penser, bien que la dépolarisation



soit rapide et de grande amplitude (Fig. 64), que la présence de nitrate aboutit à une suppression du mouvement de  $\text{Ca}^{++}$  entrant, puisque HAUDECOEUR (1978) constate la disparition du potentiel d'action en présence de nitrate. D'autre part, la présence de nitrate, anion très perméant, au contact des myofilaments, aboutit à un renforcement de l'activité ATPasique et corrélativement à une inhibition de la contraction de ces myofilaments (chapitres II et III ; Fig. 38).

Les résultats acquis ici peuvent donc résulter à la fois d'une action des ions nitrate au niveau myofibrillaire mais également au niveau membranaire.

### 5.5. Conclusion

La substitution du  $\text{Cl}^-$  par le méthylsulfate ou le nitrate permet encore le développement de la contracture potassique, mais modifie

#### Figure 64

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 258 ou 516 mM), en absence totale d'ions  $\text{Cl}^-$  extracellulaires remplacés par des ions  $\text{NO}_3^-$ .

La concentration en ions du milieu de référence  $\text{NO}_3^-$  est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{NO}_3^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM une partie des ions  $\text{Na}^+$  du milieu de référence  $\text{NO}_3^-$  par des ions  $\text{K}^+$ .

Pour l'enregistrement : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La première flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée (258 mM) après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $\text{NO}_3^-$ . La seconde flèche indique un enrichissement soudain plus important en  $\text{K}^+$  (516 mM) en présence de  $\text{NO}_3^-$  et absence de  $\text{Cl}^-$ . La troisième flèche précise le retour au milieu de référence  $\text{NO}_3^-$ .

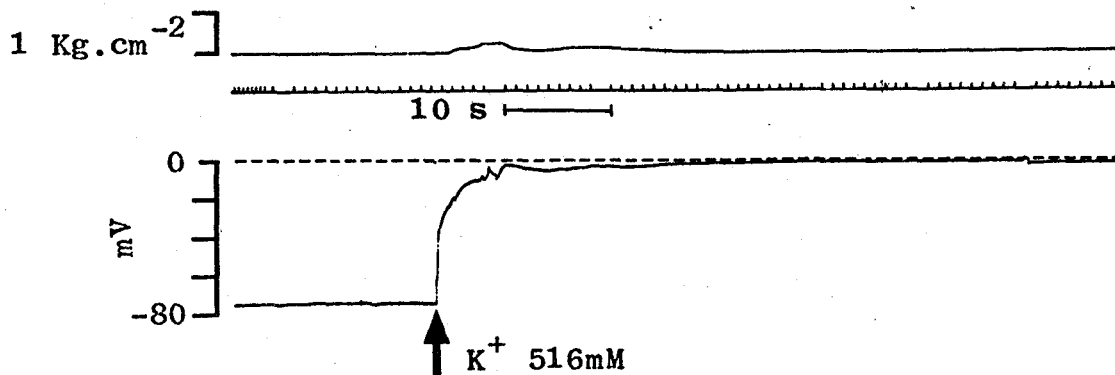


Figure 65

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en absence totale d'ions  $Cl^-$  extracellulaires remplacés par des ions  $NO_3^-$ .

La concentration en ions du milieu de référence  $NO_3^-$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $NO_3^- = 596,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence  $NO_3^-$  par des ions  $K^+$ .

Pour l'enregistrement : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $NO_3^-$ .

considérablement la tension mécanique de contracture, tant en amplitude que dans sa vitesse d'établissement. De plus, il apparaît que la présence de  $Ca^{++}$  est indispensable au développement de cette contracture qui résulterait, en fait, dans les conditions normales, de l'existence de deux composantes au courant entrant puisque la présence de  $Mn^{++}$ , bloquant le courant initial de nature calcique, n'empêche pas le développement d'une contracture. Afin de mettre plus aisément en évidence ces deux composantes, il convenait d'entreprendre une étude en présence de  $Li^+$ , utilisé comme substitut du  $Na^+$  ; le  $Li^+$  étant connu comme inhibiteur de la libération de  $Ca^{++}$  par le R.S. sur la fibre myocardique (VASSORT, 1973 ; HORACKOVA et VASSORT, 1974) peut, de ce fait, permettre à la "driving force" pour les ions  $Ca^{++}$  de conserver plus longtemps une valeur élevée.

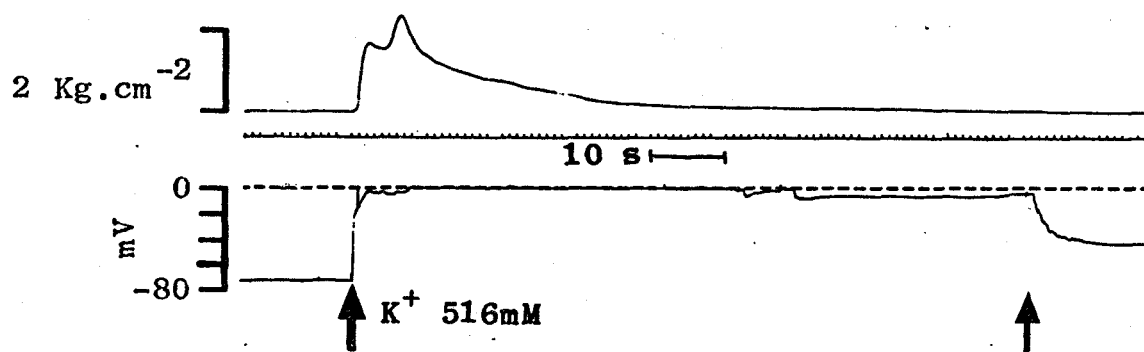


Figure 66

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en absence totale d'ions  $Cl^-$  extracellulaires remplacés par des ions  $NO_3^-$ .

La concentration en ions du milieu de référence  $NO_3^-$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $NO_3^- = 596,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence  $NO_3^-$  par des ions  $K^+$ .

Pour l'enregistrement : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La première flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $NO_3^-$ . La seconde flèche précise le retour aux conditions initiales (milieu de référence  $NO_3^-$ ).

#### 6 - Mise en évidence de deux composantes au courant entrant et analyse du décours de la contracture

GAINER (1968), sur la fibre musculaire de homard, montre que la contracture potassique est couplée avec l'influx de  $Ca^{++}$  qui accroît ainsi la concentration interne et participe à l'activation des protéines contractiles. De même, il a pu être montré, sur l'*Amphioxus*, que la secousse peut



être produite par l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  résultant de l'accroissement de la perméabilité au  $\text{Ca}^{++}$  durant le potentiel d'action et que le  $\text{Ca}^{++}$  mobilisé par la caféine n'est pas nécessaire au développement de la secousse (HAGIWARA et coll., 1971). Sur cette même préparation, HAGIWARA et KIDOKORO (1971) montrent l'existence de deux mécanismes indépendants pour l'augmentation de la perméabilité ionique de la membrane musculaire, l'une au  $\text{Na}^+$ , l'autre au  $\text{Ca}^{++}$ . De même, sur la fibre musculaire de grenouille, BEATY et STEFANI (1976 a), après avoir montré en présence de TEA, l'existence d'une réponse dépolarisante, lente, attribuée à l'augmentation de la conductance membranaire au  $\text{Ca}^{++}$ , précisent (1976 b) l'existence de deux courants entrants, l'un de nature sodique suivi d'un autre, lent, de nature calcique. L'existence de deux courants entrants est par ailleurs bien connue au niveau des préparations cardiaques atriales et ventriculaires (ROUGIER et coll., 1968, 1969 ; BERNARD et coll., 1968 ; BESSEAU et GARGOUIL, 1969 ; BESSEAU et coll., 1969 ; GARNIER et coll., 1969 ; OCHI, 1970 ; TARR, 1971). La participation au courant entrant de deux composantes est également montrée sur la fibre musculaire squelettique rapide de rat (DUVAL et LEOTY, 1977). De plus, des contractures potassiques biphasiques sont enregistrées, sur la fibre musculaire squelettique de grenouille, pour lesquelles le  $\text{Ca}^{++}$  ne semble pas requis (COSTANTIN, 1971). Il apparaît que le décours biphasique de la contracture résulte du décours biphasique de la dépolarisation dans le système T. La dépolarisation directe du système T par diffusion du  $\text{K}^+$  dans la lumière du tube est un processus relativement lent et serait probablement responsable de la composante lente de la contracture. De même, l'activité mécanique du trabécule sinoauriculaire de grenouille, présente une ou deux composantes suivant la durée de la dépolarisation. C'est ainsi que lorsque la durée d'une impulsion dépolarisante excède 100 ms et que son amplitude atteint + 75 mV, en potentiel imposé, il apparaît une seconde composante au phénomène mécanique qui consiste en l'apparition d'une contraction lente suivant la contraction rapide initiale (LEOTY et RAYMOND, 1972). La contraction initiale rapide est produite par un influx de  $\text{Ca}^{++}$  associé au courant lent entrant alors que la contraction lente est indépendante du courant entrant. Au niveau de cette préparation, la réduction du  $\text{Ca}^{++}$  (de 7,2 à 0,45 mM), en milieu pauvre en  $\text{Na}^+$ , altère le courant entrant lent et réduit la contraction. L'existence de deux composantes au niveau de l'activité mécanique du trabécule auriculaire de grenouille a également été montrée dépendante de deux sources de "calcium acti-

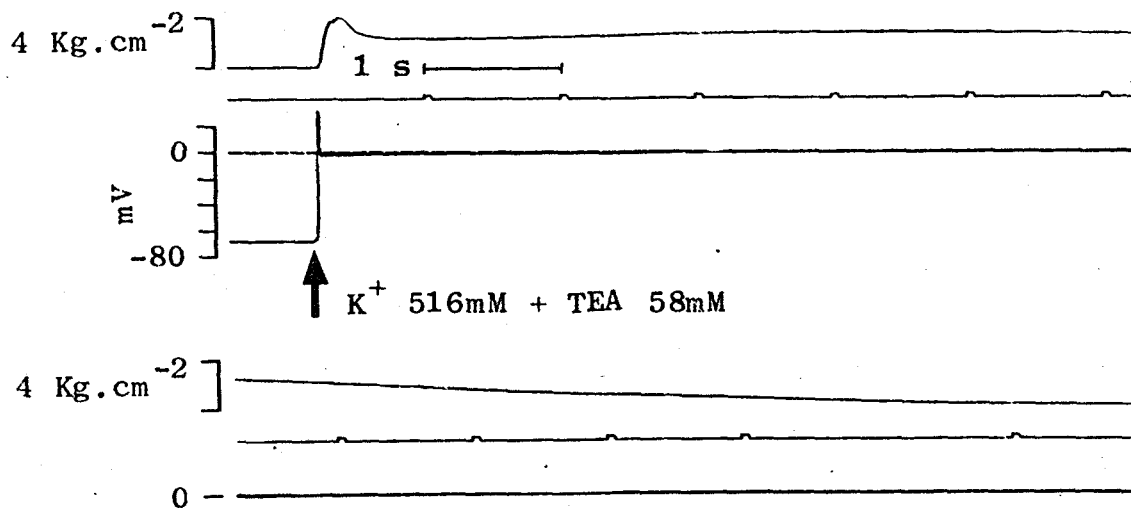
vateur" (VASSORT, 1973) : la composante "phasique" est directement reliée au courant lent entrant et dépend des ions  $\text{Ca}^{++}$  externes alors que la composante "lente" ne dépend pas directement de la présence de  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire, mais du  $\text{Na}^+$  (HORACKOVA et VASSORT, 1976 a et b). L'importance du  $\text{Na}^+$  et son remplacement par le  $\text{Li}^+$  au niveau d'une telle préparation a été bien analysée par VASSORT (1972). Au niveau du muscle semi-tendineux de grenouille, BEZANILLA et coll. (1972) montrent que la substitution de 77 mM de  $\text{Na}^+$  par du  $\text{Li}^+$  (maintenant ainsi 43 mM de  $\text{Na}^+$ ), n'affecte pas la tension tétanique durant une période de stimulation. Sur la fibre musculaire de barnacle, ALLEN et HINKE (1971) montrent que l'échange entre le  $\text{Na}^+$  et le  $\text{Li}^+$ , lorsque la préparation est baignée dans un milieu  $\text{Li}^+$ , s'effectue en deux phases : une rapide durant la première heure et une phase plus lente ensuite. A la fin de la première heure, il reste environ 50 p. 100 de  $\text{Na}^+$  dans la fibre. La diminution de la concentration interne en  $\text{Na}^+$  est également constatée, au niveau de la fibre de crabe, par VAUGHAN JONES (1976) lors de la substitution du  $\text{Na}^+$  externe par le  $\text{Li}^+$ . De plus, le  $\text{Li}^+$  influence l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  puisque DIPOLO (1973) montre que le remplacement de tout le  $\text{Na}^+$  externe par le  $\text{Li}^+$ , en présence d'une haute teneur en  $\text{Na}^+$  interne (105 mM), au niveau de la fibre de barnacle, entraîne une augmentation de l'influx de  $\text{Ca}^{++}$ . En fait, l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  dans la fibre musculaire de barnacle est étroitement dépendante des concentrations interne et externe de  $\text{Na}^+$  (DIPOLO, 1973). Enfin, sur cette même fibre de barnacle, MURAYAMA et LAKSHMINARAYANAIHAH (1977) indiquent que similairement à la choline, le  $\text{Li}^+$  utilisé en substitution du  $\text{Na}^+$  de la solution externe, n'affecte pas le courant entrant.

Au niveau de notre préparation, il importait de voir si le  $\text{Li}^+$ , qui rentre donc dans la cellule et prend la place du  $\text{Na}^+$ , va entraîner une diminution du phénomène mécanique par inhibition de la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le reticulum sarcoplasmique. La présence de  $\text{Li}^+$ , à la place du  $\text{Na}^+$ , au niveau des myofilaments ne modifie en fait pratiquement pas la tension développée par ces myofilaments isolés (chapitre III). Toutefois, afin de mieux visualiser tous ces phénomènes, et de voir l'existence éventuelle de deux composantes au courant entrant, il importe de se placer dans des conditions telles que le phénomène électrique ainsi que le phénomène mécanique soient d'analyse la plus simple possible et, de ce fait, non perturbés par la

présence d'une rectification retardée. Aussi, pour l'ensemble des expériences qui vont maintenant être décrites, le milieu de référence est toujours additionné de 58 mM de TEA qui inhibe en grande partie le courant dynamique retardé (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 ; BRULE et coll., 1976). La mise en évidence du courant dynamique entrant, par l'intermédiaire de la variation du potentiel de membrane, était ainsi plus aisée, et d'autant plus qu'il est possible de freiner la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. en remplaçant le  $\text{Na}^+$  par le  $\text{Li}^+$ . Pour cette étude, la concentration extracellulaire en  $\text{Cl}^-$  est normale, et la dépolarisation est provoquée par un milieu très enrichi en  $\text{K}^+$  (516 mM, soit 40 fois la concentration externe de référence) remplaçant mM à mM le chlorure de lithium ou le chlorure de sodium.

#### 6.1. Existence de deux composantes en présence de $\text{Na}^+$

Les fibres musculaires, isolées, sont prétraitées, par le milieu de référence additionné de 58 mM de TEA, pendant 20 minutes, avant d'être soumises à l'action du milieu riche en  $\text{K}^+$  additionné de TEA. Dans de telles conditions, il apparaît nettement, comme la figure 67 en donne un exemple, une contracture potassique qui présente deux phases, à savoir



une première phase rapide qui diminue puis une seconde qui se maintient plus longtemps. La tension maximale enregistrée lors de la 1ère phase est de  $4,07 \pm 0,18 \text{ Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 6$ ) alors que celle correspondant à la 2ème phase n'est que de  $2,57 \pm 0,54 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . De plus, la 1ère phase est rapide en ce sens qu'elle présente son maximum après  $0,15 \pm 0,03$  seconde alors que la 2ème ne présente son maximum qu'après  $3,17 \pm 1,01$  secondes ( $n = 6$ ). Parallèlement, le phénomène électrique présente un décours en deux phases. La première phase de la dépolarisation très rapide et très ample (présence d'une inversion de potentiel atteint une valeur au moins égale à  $+ 30 \text{ mV}$  puis revient très rapidement à une valeur légèrement inférieure au 0 de potentiel. Ensuite, le deuxième temps de la dépolarisation consiste en un maintien de cette dépolarisation au 0 de potentiel. L'activation apparaît pour une valeur de potentiel de  $- 42,6 \pm 3,7 \text{ mV}$ . Le prétraitement simultané en TEA (58 mM) et en  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM) entraîne la suppression de la phase rapide de la contracture potassique et une modification du phénomène électrique ainsi que l'atteste la figure 68. En effet, la composante "phasique" correspondant à la phase rapide est pratiquement annulée puisque la tension n'est plus égale qu'à  $0,29 \pm 0,21 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Par contre, la composante lente

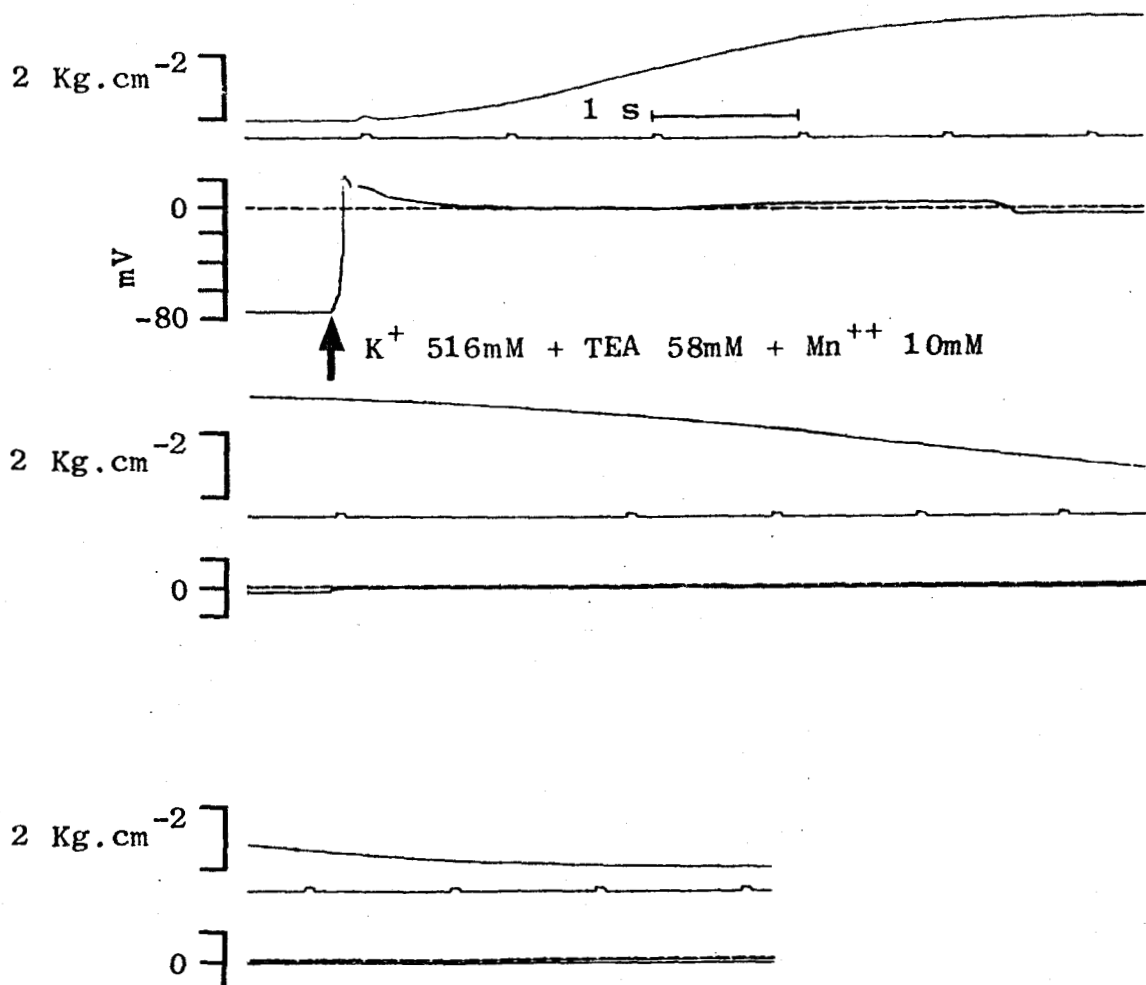
#### Figure 67

*Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM).*

La concentration en ions du milieu de référence TEA est ;  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{TEA}^+ = 58 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 654,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $\text{Na}^+$  du milieu de référence TEA par des ions  $\text{K}^+$ .

Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence TEA.

est plus importante puisque la tension atteint une valeur de  $3,49 \pm 0,25$   $\text{Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 6$ ). Dans ces conditions (présence de  $\text{Mn}^{++}$ ), l'augmentation de tension correspondant à cette deuxième phase peut s'expliquer dans la mesure où aucune tension n'est développée auparavant et où de ce fait la concentration interne faible en  $\text{Ca}^{++}$  permet une plus grande entrée de  $\text{Ca}^{++}$  liée à l'activation lente de la conductance membranaire au  $\text{Ca}^{++}$ . Le maximum de tension correspondant à la première phase, bien que quasi inexistante, est atteint après  $0,07 \pm 0,02$  seconde alors que celui de la seconde phase l'est après  $4,28 \pm 1,54$  secondes ( $n = 6$ ). Quant au phénomène électrique que constitue la dépolarisation, il révèle là encore une inversion de potentiel cependant plus faible puisqu'il n'atteint que  $+ 16$  mV en moyenne ( $+ 16 \pm 4$  mV ;  $n = 9$ ) mais plus durable, et que le potentiel, après avoir



atteint la valeur la plus positive revient lentement à la valeur 0 (plus de 500 ms sont requises). Il faut mentionner aussi que le seuil d'activation de la conductance membranaire responsable du courant entrant se produit alors, en présence de  $Mn^{++}$ , pour une valeur moyenne de potentiel égale à  $-28,4 \pm 7,3$  mV ( $n = 9$ ). En fait, il semble que les ions  $Mn^{++}$  provoquent l'inhibition de la phase rapide de la contracture par le biais de leur action au niveau de l'activation de la conductance initiale aux ions  $Ca^{++}$ . Ainsi, cette inhibition par le  $Mn^{++}$  de l'entrée précoce de  $Ca^{++}$  laisse à penser que la composante initiale "rapide" de la contracture est bien liée à l'entrée de  $Ca^{++}$ . La seconde phase, lente, de la contracture peut résulter de l'existence d'une deuxième composante au courant entrant, non bloquée par les ions  $Mn^{++}$  et qui s'activerait pour un seuil de potentiel plus élevé, moins négatif. Comme par ailleurs, il est montré que l'influx de  $Ca^{++}$  permet la libération de  $Ca^{++}$  par le R.S. et que l'absence de  $Na^+$  du milieu intracellulaire, remplacé par du  $Li^+$ , conduit à une libération moindre de  $Ca^{++}$  par le R.S., il apparaît ainsi que l'apport de  $Li^+$  doit permettre de mieux discerner ce qui revient, dans la contracture, aux deux composantes de courant entrant et leurs effets sur la libération de  $Ca^{++}$  par le R.S.

#### Figure 68

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 mM à 516 mM) en présence de TEA (58 mM) et de  $Mn^{++}$  (10 mM).

La concentration en ions du milieu de référence TEA- $Mn^{++}$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ; TEA<sup>+</sup> = 58 mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ;  $Cl^- = 674,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence TEA- $Mn^{++}$  par des ions  $K^+$ .

Le tracé est présenté en trois parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM) après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence TEA- $Mn^{++}$ .

## 6.2. Evolution des composantes de la contracture et du potentiel de membrane en milieu $\text{Li}^+$

Les fibres musculaires sont préalablement baignées, pendant 40 minutes, dans le milieu de référence où le NaCl a été remplacé mM à mM par le Li Cl. En effet ce temps est nécessaire pour permettre un remplacement suffisant du  $\text{Na}^+$  intracellulaire par du  $\text{Li}^+$  (50 p. 100 de remplacement après une heure sur la fibre de barnacle comme le montrent ALLEN et HINKE, 1971). Elles sont ensuite placées dans le même milieu additionné de 58 mM de TEA, pendant 20 minutes, avant d'être soumises à l'action du milieu riche en  $\text{K}^+$ . Sous l'action d'un tel milieu, la contracture biphasique est accentuée ainsi que le montre la figure 69. La première phase présente un maximum égal à  $1,82 \pm 0,28 \text{ Kg.cm}^{-2}$  qui est obtenu après  $0,12 \pm 0,04$  seconde ( $n = 6$ ), alors que pour la seconde phase, plus lente, le maximum n'est que de  $1,18 \pm 0,53 \text{ Kg.cm}^{-2}$  et n'est atteint qu'après  $2,9 \pm 0,98$  secondes. Quant au phénomène électrique, il conserve le même décours qu'en présence de  $\text{Na}^+$  si ce n'est que la caractéristique biphasique de la variation du potentiel est plus nette ; la phase initiale de dépolarisation conduit à une inversion de potentiel de + 30 mV et la seconde phase correspond à un maintien du potentiel à une valeur voisine du 0 de potentiel. L'activation initiale intervient dans ces conditions pour un potentiel égal à  $-34 \pm 0,5 \text{ mV}$ . Si, en présence de  $\text{Li}^+$ , l'allure biphasique est maintenue, il est à souligner que la tension mécanique développée par la fibre lors des deux phases, rapide et lente, est bien plus faible. Il est toutefois possible de constater que les rapports des tensions de la phase rapide et de celles de la phase lente, respectivement en milieu  $\text{Na}^+$  et en milieu  $\text{Li}^+$ , sont équivalents (2,24 et 2,18). Le phénomène électrique n'étant quasiment pas perturbé, il semble vraisemblable d'attribuer la diminution de l'ampleur du phénomène mécanique en milieu  $\text{Li}^+$  à la réduction voire l'inhibition de la libération du  $\text{Ca}^{++}$  par les citernes du R.S.. De plus, si tel est le cas, cette libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. interviendrait par ailleurs très tôt, dès la première composante du phénomène mécanique. Cette dernière hypothèse est d'ailleurs en accord avec les résultats de BRULE et coll. (1978) obtenus sur la même préparation ; ils montrent, qu'en milieu  $\text{Li}^+$ , le potentiel d'action augmente en amplitude (présence d'une inversion de potentiel, absente normalement en présence de  $\text{Na}^+$ ). Ce résultat ne peut s'interpréter qu'en considérant le maintien en présence de  $\text{Li}^+$  de la "driving force" aux ions



$\text{Ca}^{++}$  à une valeur élevée, d'autant que MURAYAMA et LAKSHMINARAYANAIAN (1977) sur la fibre de balane montrent que les ions  $\text{Li}^+$  sont sans effet sur la recatification retardée et que, dans nos conditions expérimentales, le TEA est présent.

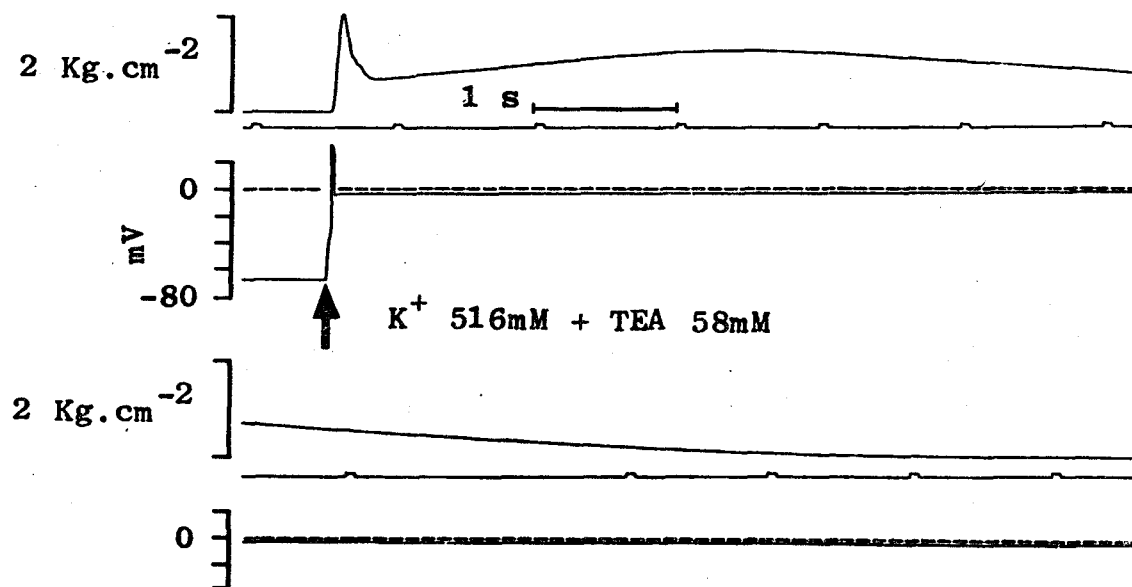


Figure 69

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM), de  $\text{Li}^+$  (513 mM) remplaçant les ions  $\text{Na}^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $\text{CO}_3\text{H}^- \text{Na}^+$ ).

La concentration en ions du milieu de référence  $\text{Li}^+$ -TEA est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 2,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Li}^+ = 513 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{TEA}^+ = 58 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 654,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est réalisé en remplaçant  $\text{mM}$  à  $\text{mM}$  la plus grande partie des ions  $\text{Li}^+$  du milieu de référence  $\text{Li}^+$ -TEA par des ions  $\text{K}^+$ .

Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $\text{Li}^+$ -TEA qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 40 minutes dans le même milieu  $\text{Li}^+$  mais sans TEA.

Le prétraitement de la fibre en  $\text{Li}^+$  et  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM) se traduit également, comme dans le cas du milieu renfermant du  $\text{Na}^+$ , par une suppression de la phase rapide de la contracture potassique. La figure 70 montre en effet que le décours du phénomène mécanique, tout comme par ailleurs celui concernant le phénomène électrique, est très peu différent de celui obtenu en présence de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Mn}^{++}$ . La seconde phase de la contracture est lente et durable, et la tension maximale enregistrée est dans ce cas de  $0,87 \pm 0,25 \text{ Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 6$ ). Ce maximum n'est atteint qu'après  $3,28 \pm 0,66$  secondes. Là encore, le phénomène électrique que constitue la dépolarisation conduit à une inversion de potentiel de grande durée (de l'ordre de 0,91 seconde). De même, le seuil d'activation se produit en milieu  $\text{Li}^+$  et  $\text{Mn}^{++}$  pour une valeur de potentiel beaucoup plus élevée (de  $-26,3 \pm 4,6 \text{ mV}$ ). Toutefois, en ce qui concerne la tension développée, il faut préciser que si en absence de  $\text{Mn}^{++}$ , le rapport des tensions maximales des composantes rapides et lentes en présence de  $\text{Na}^+$  et de  $\text{Li}^+$  ( $T. \text{Na}^+ / T. \text{Li}^+$ ) est très voisin de 2,2 ; en présence de  $\text{Mn}^{++}$ , la tension correspondant à la phase lente est 4 fois plus forte, en présence de  $\text{Na}^+$  qu'en présence de  $\text{Li}^+$ . Ce rapport plus grand (presque multiplié par un facteur 2) en absence de composante rapide pourrait être interprété en tenant compte d'un gradient de concentration de  $\text{Ca}^{++}$  entre l'intérieur du R.S. et le myoplasme plus élevé dans la mesure où le premier influx inhibé n'a donc pas permis une première libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. dans le myoplasme. Cette augmentation du rapport peut également résulter d'une absence d'entrée de  $\text{Na}^+$  en milieu  $\text{Li}^+$  dans la mesure où HAUDECOEUR (1975) montre qu'en milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{++}$  et contenant du TEA, dans des conditions de potentiel imposé, se développe une composante lente de courant entrant, portée par les ions  $\text{Na}^+$  et dans la mesure où un courant entrant de  $\text{Na}^+$  peut rendre compte d'une libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. au niveau des fibres squelettiques et cardiaques de grenouille (CAILLE et coll., 1977 a et b ; GARNIER et coll., 1977). Toutefois, si comme il peut être supposé, les différentes phases de la contracture dépendent d'une entrée de  $\text{Ca}^{++}$ , on doit s'attendre à ce que la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire conduise là encore à une annulation des différentes composantes de la contracture, comme cela a déjà été observé en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  (Fig. 63, cf. paragraphe précédent).

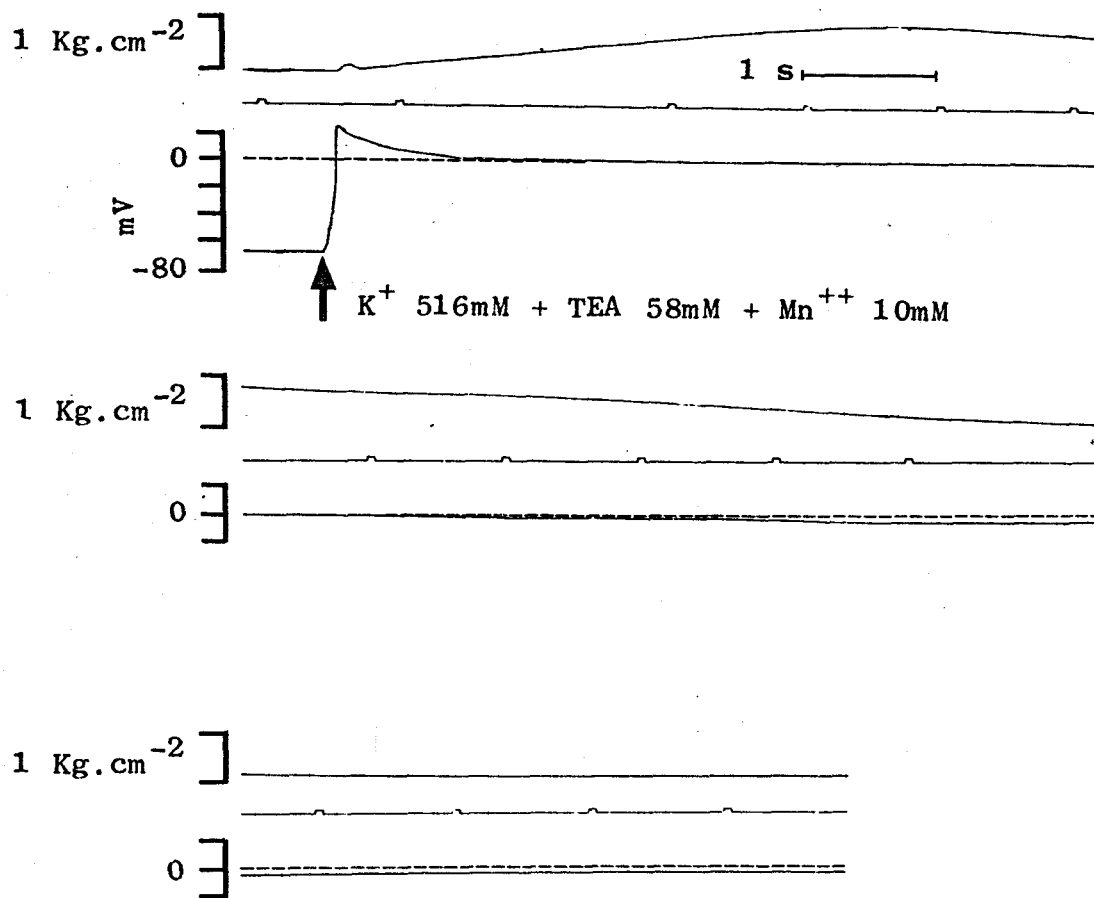


Figure 70

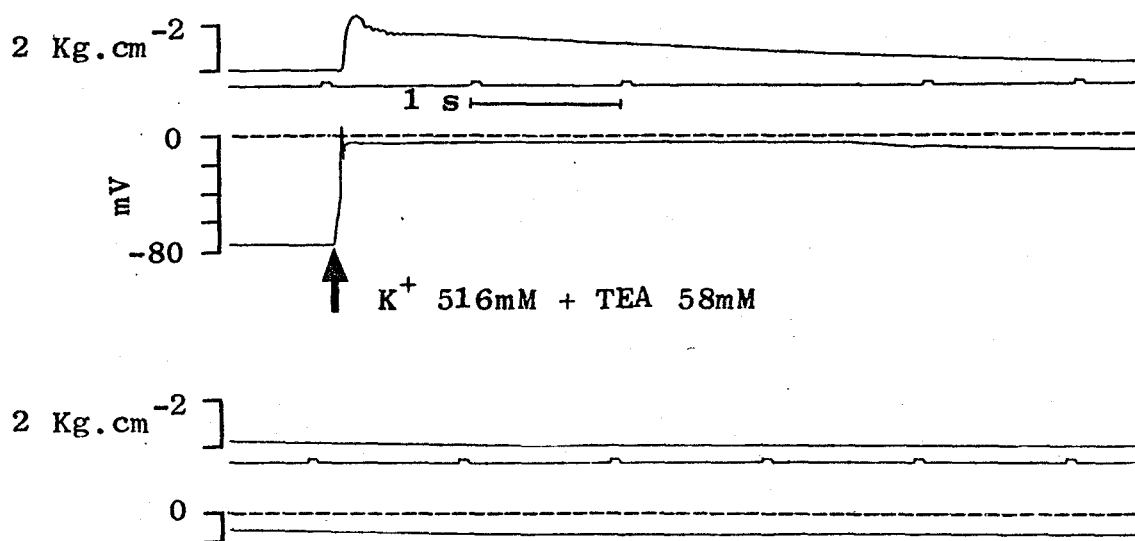
Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM), de  $Mn^{++}$  (10 mM) et de  $Li^+$  (513 mM), remplaçant les ions  $Na^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $CO_3H^-Na^+$ ).

La concentration en ions du milieu de référence  $Li^+-Mn^{++}-TEA$  est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 2,6$  mM ;  $Li^+ = 513$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ; TEA = 58 mM ;  $Cl^- = 674,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Li^+$  du milieu de référence  $Li^+, Mn^{++}, TEA$  par des ions  $K^+$ .

Le tracé est présenté en trois parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM) après 20 minutes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $Li^+-Mn^{++}-TEA$  qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 40 minutes dans le même milieu  $Li^+$  mais sans TEA et sans  $Mn^{++}$ .

### 6.3. Evolution des deux composantes en milieu dépourvu de $\text{Ca}^{++}$

Comme pour les expériences précédentes, les fibres sont placées dans un milieu contenant 58 mM de TEA pendant 20 minutes. Elles sont ensuite baignées par un milieu dépourvu de  $\text{Ca}^{++}$  pendant 20 secondes avant d'être soumises à l'action du milieu enrichi en  $\text{K}^+$  (40 fois la normale). En effet, si l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  est un maillon indispensable pour le déclenchement de la contracture, la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  externe, diminuant sans délai l'influx de  $\text{Ca}^{++}$ , doit dans un laps de temps très bref conduire à une suppression ou à une diminution importante de l'amplitude de la contracture ; c'est la raison pour laquelle un temps de 20 secondes a été choisi. Dans de telles conditions, la suppression pendant 20 secondes du  $\text{Ca}^{++}$  externe, en présence de  $\text{Mg}^{++}$ , conduit à une diminution, voir à une suppression selon les fibres testées, du phénomène mécanique ainsi que l'attestent les figures 71 et 72. De même, la vitesse de la phase de dépolarisation est considérablement réduite. C'est ainsi, que dans le cas où la réponse mécanique est possible, le phénomène électrique biphasique ne se traduit initialement que par une très faible inversion de potentiel, le potentiel de membrane se stabilisant ensuite à une valeur nettement négative (- 15 mV) (Fig. 71).



Sur d'autres préparations (Fig. 72) le phénomène électrique ne peut être séparé en deux phases. Sur cinq fibres testées dans ces conditions, deux d'entre elles ont répondu comme dans le cas de la figure 71 et, la tension maximale développée lors de la première phase est dans les 2 cas de  $2,35 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Pour les trois autres, les tensions sont extrêmement réduites (0 ; 0,5 et  $0,14 \text{ Kg.cm}^{-2}$ ). Il apparaît donc que la présence de  $\text{Ca}^{++}$  soit indispensable au développement des deux composantes (rapide et lente) de la contracture.

Si au cours du prétraitement par le TEA sont ajoutés, comme pour les expériences précédentes, des ions  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM), le phénomène mécanique est, dans tous les cas, aboli. Sur quatre fibres testées en absence de  $\text{Ca}^{++}$  et en présence de  $\text{Mn}^{++}$ , (la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  n'intervenant là encore que 20 secondes avant l'application du milieu enrichi en  $\text{K}^+$ ) aucune n'a développé de tension mécanique puisque la moyenne est de  $0,05 \pm 0,10 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Cependant, le phénomène électrique a un décours voisin de ceux observés en pré-

### Figure 71

*Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM) et en absence de  $\text{Ca}^{++}$ .*

*La concentration en ions du milieu de référence TEA (58 mM) sans  $\text{Ca}^{++}$  est :  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ; TEA =  $58 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 631,1 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $\text{Na}^+$  du milieu de référence TEA sans  $\text{Ca}^{++}$  par des ions  $\text{K}^+$ .*

*Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 secondes de prétraitement de la fibre en milieu de référence TEA (58 mM) sans  $\text{Ca}^{++}$ , qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 20 minutes dans le même milieu TEA mais contenant des ions  $\text{Ca}^{++}$  (11,8 mM).*

sence de  $Mn^{++}$  et de  $Ca^{++}$ , bien que l'inversion de potentiel soit plus faible et que le potentiel de membrane se stabilise à une valeur nettement négative ( $-18$  mV) (Fig. 73). Dans de telles conditions, l'absence de  $Ca^{++}$  et la présence de  $Mn^{++}$  suppriment la possibilité d'une entrée de  $Ca^{++}$ .

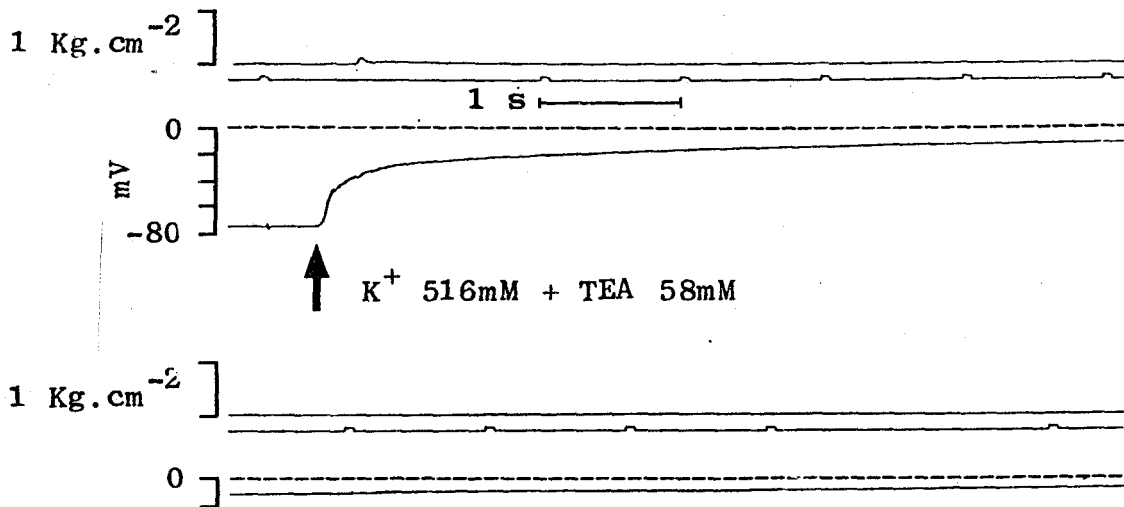


Figure 72

Dépolarisation membranaire (sans développement de contracture potassique) d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM) et en absence de  $Ca^{++}$ .

La concentration en ions du milieu de référence TEA (58 mM) sans  $Ca^{++}$  est :  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ; TEA = 58 mM ;  $Cl^- = 631,1$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence TEA sans  $Ca^{++}$  par des ions  $K^+$ .

Le tracé est présenté en deux parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre le développement d'une très brève et très faible tension mécanique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 secondes de prétraitement de la fibre en milieu de référence TEA (58 mM) sans  $Ca^{++}$ , qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 20 minutes dans le même milieu TEA mais contenant des ions  $Ca^{++}$  (11,8 mM).

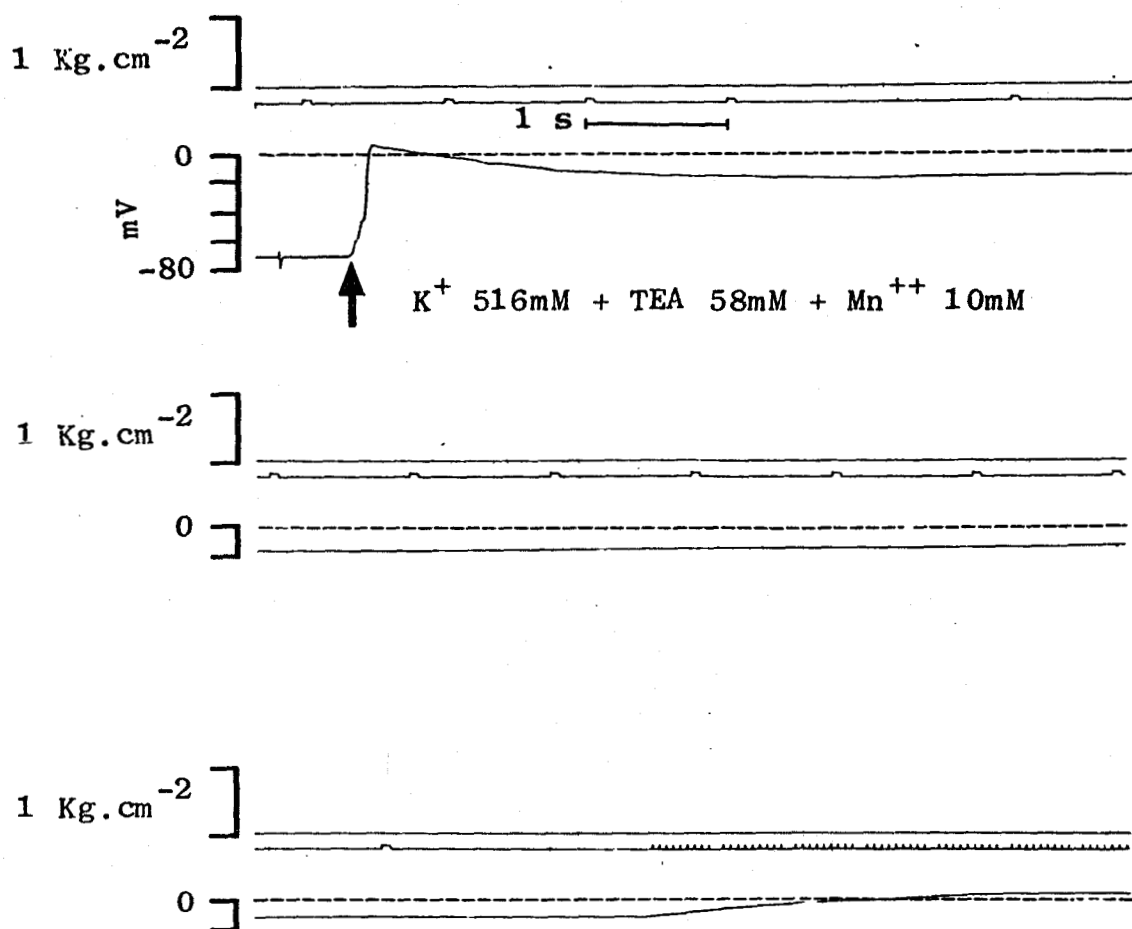


Figure 73

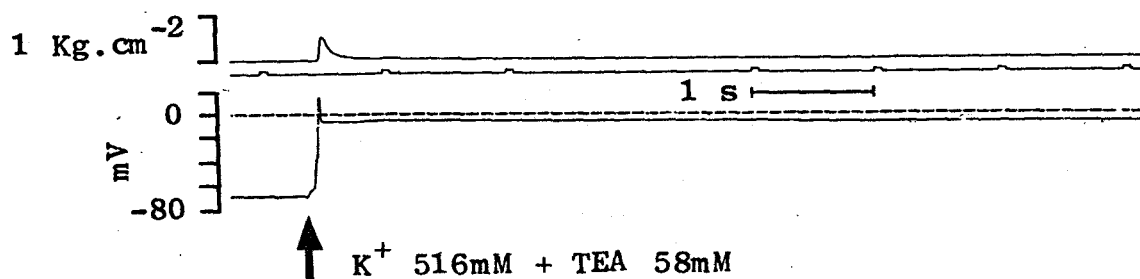
Dépolarisation membranaire (sans développement de contracture potassique) d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produite par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM), de  $Mn^{++}$  (10 mM) et en absence de  $Ca^{++}$ .

La concentration en ions du milieu de référence TEA,  $Mn^{++}$  sans  $Ca^{++}$  est :  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 515,6$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ; TEA = 58 mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ;  $Cl^- = 651,1$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Na^+$  du milieu de référence TEA,  $Mn^{++}$  sans  $Ca^{++}$  par des ions  $K^+$ .

Le tracé est présenté en trois parties. Pour chacune des parties : la trace du haut révèle l'absence de développement de tension mécanique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 secondes de prétraitement de la fibre en milieu de référence TEA,  $Mn^{++}$  sans  $Ca^{++}$ , qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 20 minutes dans le même milieu TEA,  $Mn^{++}$  mais contenant des ions  $Ca^{++}$  (11,8 mM).

Cependant, le maintien d'une réponse électrique (Fig. 73) permet de penser que la deuxième composante pourrait être, dans les conditions normales, à la fois calcique et sodique. Dans ces conditions, le remplacement du  $\text{Na}^+$  externe par le  $\text{Li}^+$ , en absence de  $\text{Ca}^{++}$ , pourrait modifier l'allure du phénomène électrique. Pour cette expérimentation, les fibres sont préalablement prétraitées pendant 40 minutes dans le milieu de référence dont le  $\text{Li}^+$  remplace le  $\text{Na}^+$ , puis pendant 20 minutes dans ce même milieu additionné de TEA (58 mM), puis enfin, pendant 20 secondes en milieu  $\text{Li}^+$ -TEA sans  $\text{Ca}^{++}$ . Dès lors, comme le montre la figure 74, l'application du milieu enrichi en  $\text{K}^+$  provoque le développement d'un phénomène mécanique phasique et rapide de très faible amplitude rendue possible, selon toute vraisemblance, par la présence d'une faible quantité d'ions  $\text{Ca}^{++}$  dans la lumière des tubules (la privation de  $\text{Ca}^{++}$  n'étant survenue que 20 secondes avant la dépolarisation produite par le  $\text{K}^+$  en excès). La tension n'est en effet que de  $0,26 \pm 0,23 \text{ Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 4$ ), car la présence de  $\text{Li}^+$  inhibe la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. La seconde composante n'est en aucun cas visible, dans ces conditions, contrairement à celle enregistrée en absence de  $\text{Ca}^{++}$  et en présence de  $\text{Na}^+$  (pour les fibres présentant une réponse, voir figure 71).

Il est donc ainsi montré que le  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire est indispensable au développement de la contracture et que de plus, son absence entraîne très rapidement (20 secondes) une diminution voire une annulation d'un influx de  $\text{Ca}^{++}$  indispensable au développement de la contraction.





6.4. Evolution des deux composantes en milieu  $\text{Li}^+$   
(les ions  $\text{Sr}^{++}$  remplaçant les ions  $\text{Ca}^{++}$ )

Des travaux effectués en voltage imposé sur les fibres atriales de grenouille montrent que l'addition d'ions  $\text{Ca}^{++}$  ou d'ions  $\text{Sr}^{++}$  augmentent l'amplitude du courant lent entrant (BERNARD et coll., 1974). Sur cette même préparation, ces auteurs montrent également que le remplacement du  $\text{Ca}^{++}$  par du  $\text{Sr}^{++}$  augmente considérablement la durée du potentiel d'action. Sur le ventricule de mammifères, GUILBAULT (1966) observe un retard de la repolarisation. De même, le remplacement des ions  $\text{Ca}^{++}$  par des ions  $\text{Sr}^{++}$  dans le liquide de perfusion produit, sur le ventricule de roussette, un effet inotrope positif (GUILBAULT et coll., 1963 a et b). Au niveau du ventricule de crapaud, BASS et coll. (1975) observent également une augmentation de la tension isométrique lorsque le  $\text{Sr}^{++}$  est utilisé

Figure 74

Dépolarisation membranaire et tension mécanique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $\text{K}^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM), de  $\text{Li}^+$  (513 mM) remplaçant les ions  $\text{Na}^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $\text{CO}_3\text{H}^-\text{Na}^+$ ) et en absence de  $\text{Ca}^{++}$ .

La concentration en ions du milieu de référence  $\text{Li}^+$ , TEA sans  $\text{Ca}^{++}$  est :  $\text{Mg}^{++} = 23,6$  mM ;  $\text{Na}^+ = 2,6$  mM ;  $\text{Li}^+ = 513$  mM ;  $\text{K}^+ = 12,9$  mM ;  $\text{TEA}^+ = 58$  mM ;  $\text{Cl}^- = 631,1$  mM ;  $\text{CO}_3\text{H}^- 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $\text{K}^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $\text{Li}^+$  du milieu de référence  $\text{Li}^+$ , TEA sans  $\text{Ca}^{++}$  par des ions  $\text{K}^+$ .

Pour l'enregistrement : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $\text{K}^+$  est soudainement augmentée (516 mM), après 20 secondes de prétraitement de la fibre en milieu de référence  $\text{Li}^+$ , TEA sans  $\text{Ca}^{++}$ , qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 20 minutes dans le même milieu  $\text{Li}^+$ , TEA mais contenant des ions  $\text{Ca}^{++}$  (11,8 mM) qui fait lui-même suite à un prétraitement de la fibre, pendant 40 minutes, dans le milieu  $\text{Li}^+$  dépourvu de TEA mais contenant les ions  $\text{Ca}^{++}$  (11,8 mM).

comme substitut du  $\text{Ca}^{++}$ . Ce phénomène est lié à la prolongation du potentiel d'action observée par ces mêmes auteurs. Par ailleurs, les ions  $\text{Sr}^{++}$ , tout comme les ions  $\text{Ba}^{++}$  et  $\text{Ca}^{++}$ , qui provoquent la libération de  $\text{Ca}^{++}$  des stocks intracellulaires, peuvent produire des contractures myocardiques (voir SLAVIČEK, 1972). Toutefois, en présence d'ATP, la libération de  $\text{Ca}^{++}$  induite par le  $\text{Sr}^{++}$  et la libération de  $\text{Sr}^{++}$  induite par le  $\text{Ca}^{++}$  sont partielles et transitoires probablement parce que ces deux cations sont compétitifs pour un système transporteur commun (MERMIER et HASSELBACH, 1976). L'accumulation de  $\text{Sr}^{++}$  par le R.S. est à peu près proportionnelle à la concentration de  $\text{Sr}^{++}$  externe. De même ASHLEY (1967), à la suite de son étude sur l'efflux de  $\text{Sr}^{89}$  des fibres de balane, suggère que cet ion est lié et mobilisé à l'intérieur de ces fibres de la même manière que le  $\text{Ca}^{++}$ . Cependant, au niveau de la fibre musculaire de homard, GAINER (1968) précise que les sites calciques impliqués dans le couplage excitation-contraction sont hautement sélectifs aux ions  $\text{Ca}^{++}$  et même les ions  $\text{Sr}^{++}$ , qui se rapprochent étroitement des ions  $\text{Ca}^{++}$  quant à leurs effets dans d'autres systèmes, ne sont pas capables de restaurer les contractures potassiques au niveau de fibres privées de  $\text{Ca}^{++}$ . Parallèlement, cet auteur montre que le décours de la dépolarisation est modifié, et si le maximum atteint est sensiblement le même, la vitesse est considérablement réduite en milieu  $\text{Sr}^{++}$ . Au niveau de la fibre musculaire de crabe, MOUNIER et VASSORT (1975 a) montrent que le courant entrant en milieu  $\text{Sr}^{++}$  se trouve accru.

En ce qui concerne notre expérimentation, la fibre de crabe est d'abord prétraitée, pendant 40 minutes dans le milieu de référence où le  $\text{Li}^+$  remplace le  $\text{Na}^+$  et où le  $\text{Sr}^{++}$  remplace le  $\text{Ca}^{++}$ . Elle est ensuite placée en présence de ce même milieu additionné de 58 mM de TEA pendant 20 minutes avant d'être soumise à l'action du milieu enrichi en  $\text{K}^+$ . Dans de telles conditions, la figure 75 montre que la contracture biphasique enregistrée en milieu  $\text{Li}^+-\text{Ca}^{++}$  (Fig. 69) est considérablement modifiée lorsque le  $\text{Sr}^{++}$  est utilisé à la place du  $\text{Ca}^{++}$ . A première vue, en effet, la première phase rapide de la contracture a disparu, seule persiste une contracture qui se développe lentement. Le maximum de tension équivalent en moyenne à  $1,84 \pm 0,34 \text{ Kg.cm}^{-2}$  n'est atteint qu'après  $4,70 \pm 0,92$  secondes ( $n = 4$ ). De même, le phénomène électrique est considérablement modifié par rapport à celui observé en milieu où le  $\text{Ca}^{++}$  est présent ; il se manifeste

par une inversion de potentiel durable et un décours sensiblement analogue à celui obtenu précédemment dans les expériences en milieu  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Li}^+ - \text{Ca}^{++}$  additionné d'ions  $\text{Mn}^{++}$  (voir figures 68 et 70). Ainsi, il ne se manifesterait en milieu  $\text{Sr}^{++}$  qu'une composante de courant entrant pour laquelle le  $\text{Sr}^{++}$  est, selon toute vraisemblance, capable de remplacer le  $\text{Ca}^{++}$ . La disparition apparente d'une composante du phénomène électrique et du phénomène mécanique montre qu'elle pourrait être spécifiquement liée à un influx de  $\text{Ca}^{++}$ . Ce résultat est à rapprocher de celui de GAINER (1968) qui montre que, sur la fibre de homard, la substitution du  $\text{Ca}^{++}$  par le  $\text{Sr}^{++}$  ne permet pas le maintien de la contracture. Toutefois, la tension plus faible de contracture (Fig. 75) enregistrée sur la fibre de crabe, en milieu  $\text{Sr}^{++}$ , peut être imputable à la présence de  $\text{Li}^+$  remplaçant le  $\text{Na}^+$  extracellulaire.

Dans de telles conditions, il semblait intéressant de connaître si le  $\text{Mn}^{++}$ , inhibant le courant entrant "précoce" de  $\text{Ca}^{++}$ , peut conduire, en milieu  $\text{Sr}^{++}$ , à une suppression de la contracture "phasique". En fait, la présence d'ions  $\text{Mn}^{++}$  (10 mM) au cours du prétraitement en milieu  $\text{Li}^+ \text{Sr}^{++}$ , aboutit à une réduction considérable du phénomène mécanique ainsi que l'atteste la figure 76. La tension moyenne qui n'est plus que de  $0,85 \pm 0,38 \text{ Kg.cm}^{-2}$  ( $n = 5$ ) se développe beaucoup plus lentement qu'en absence de  $\text{Mn}^{++}$  puisque le maximum n'est, cette fois, atteint qu'après  $8,10 \pm 0,60$  secondes. Parallèlement, la vitesse de la phase initiale de dépolarisation est considérablement réduite et ne présente plus d'inversion de potentiel. Il semble difficile d'interpréter ce résultat dans la mesure où, dans les conditions précédentes (présence de  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire), le  $\text{Mn}^{++}$  ne semblait pas intervenir au niveau des deuxièmes composantes de courant et de tension mécanique. Aussi, faut-il, semble-t-il, envisager qu'en absence de  $\text{Mn}^{++}$ , en milieu  $\text{Sr}^{++}$ , se développeraient toujours deux composantes mais que la première très ralentie masquerait la seconde d'amplitude plus faible. Cette hypothèse s'accorde avec les résultats (Figs 75 et 76) qui montrent qu'en absence de  $\text{Mn}^{++}$  le seuil de potentiel d'activation apparaît pour une valeur de  $-40 \text{ mV}$  alors qu'en présence de  $\text{Mn}^{++}$ , le seuil d'activation correspondant au courant lent apparaît pour une valeur de  $-15$  à  $-20 \text{ mV}$ . Bien que le courant entrant de  $\text{Sr}^{++}$  puisse être plus ample que celui de  $\text{Ca}^{++}$  (MOUNIER et VASSORT, 1975 a) le maximum de

tension, de l'ordre de  $2 \text{ Kg.cm}^{-2}$ , correspond à celui observé (lère composante), en présence de  $\text{Ca}^{++}$  et de  $\text{Li}^+$  (figure 69) ; la seule variation réside dans la vitesse d'établissement de la contracture qui peut être expliquée par une cinétique plus lente du courant de  $\text{Sr}^{++}$ , que celle du courant de  $\text{Ca}^{++}$ , résultant en une activation lente des myofilaments.

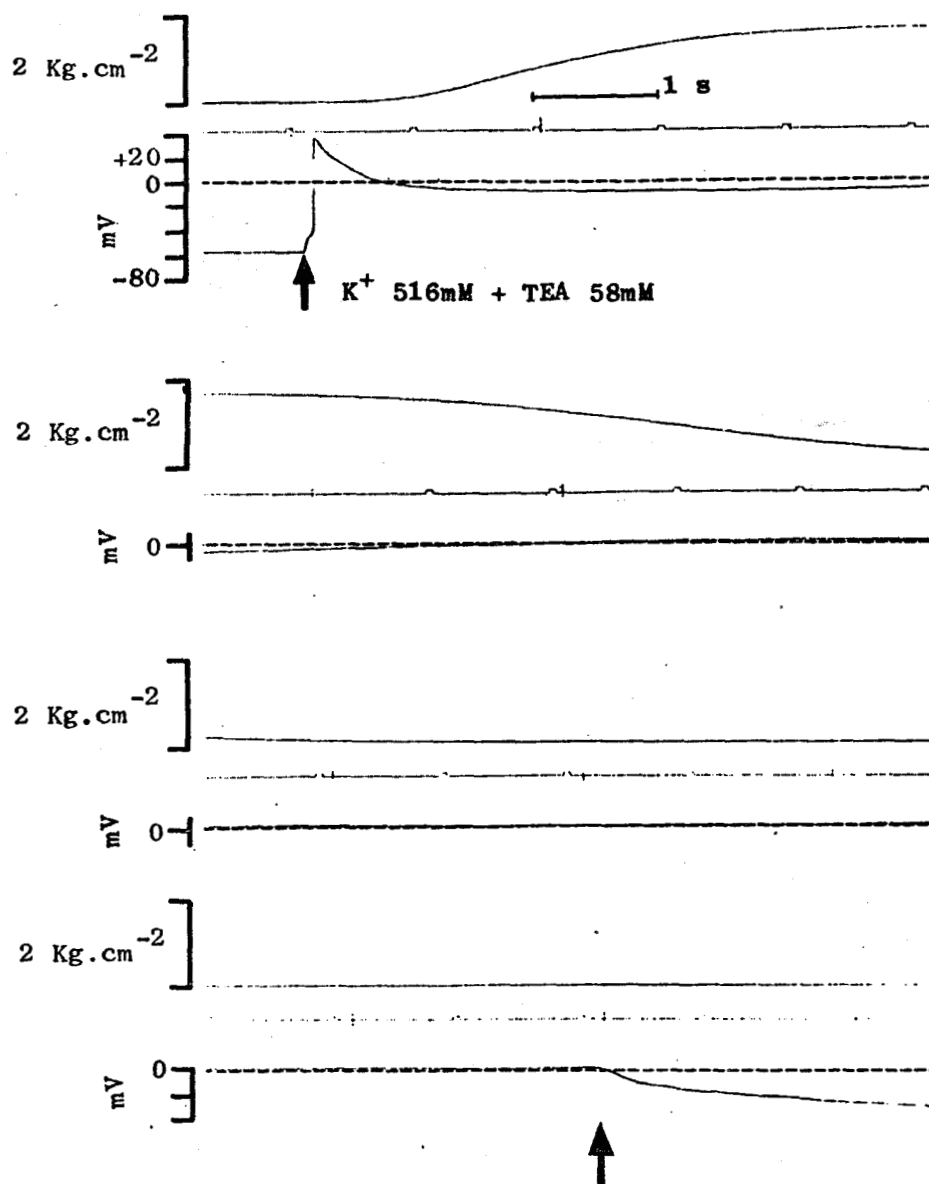


Figure 75

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM), de  $Li^+$  (513 mM) remplaçant les ions  $Na^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $CO_3H^-Na^+$ ) et de  $Sr^{++}$  remplaçant les ions  $Ca^{++}$ .

La concentration en ions du milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA est :  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 2,6$  mM ;  $Li^+ = 513$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Sr^{++} = 11,8$  mM ;  $TEA^+ = 58$  mM ;  $Cl^- = 654,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Li^+$  du milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA par des ions  $K^+$ .

Le tracé est présenté en quatre parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La première flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM) après 20 minutes de prétraitement de la fibre dans le milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA, qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 40 minutes dans le même milieu  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$  mais dépourvu de TEA. La seconde flèche précise le retour au milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA.

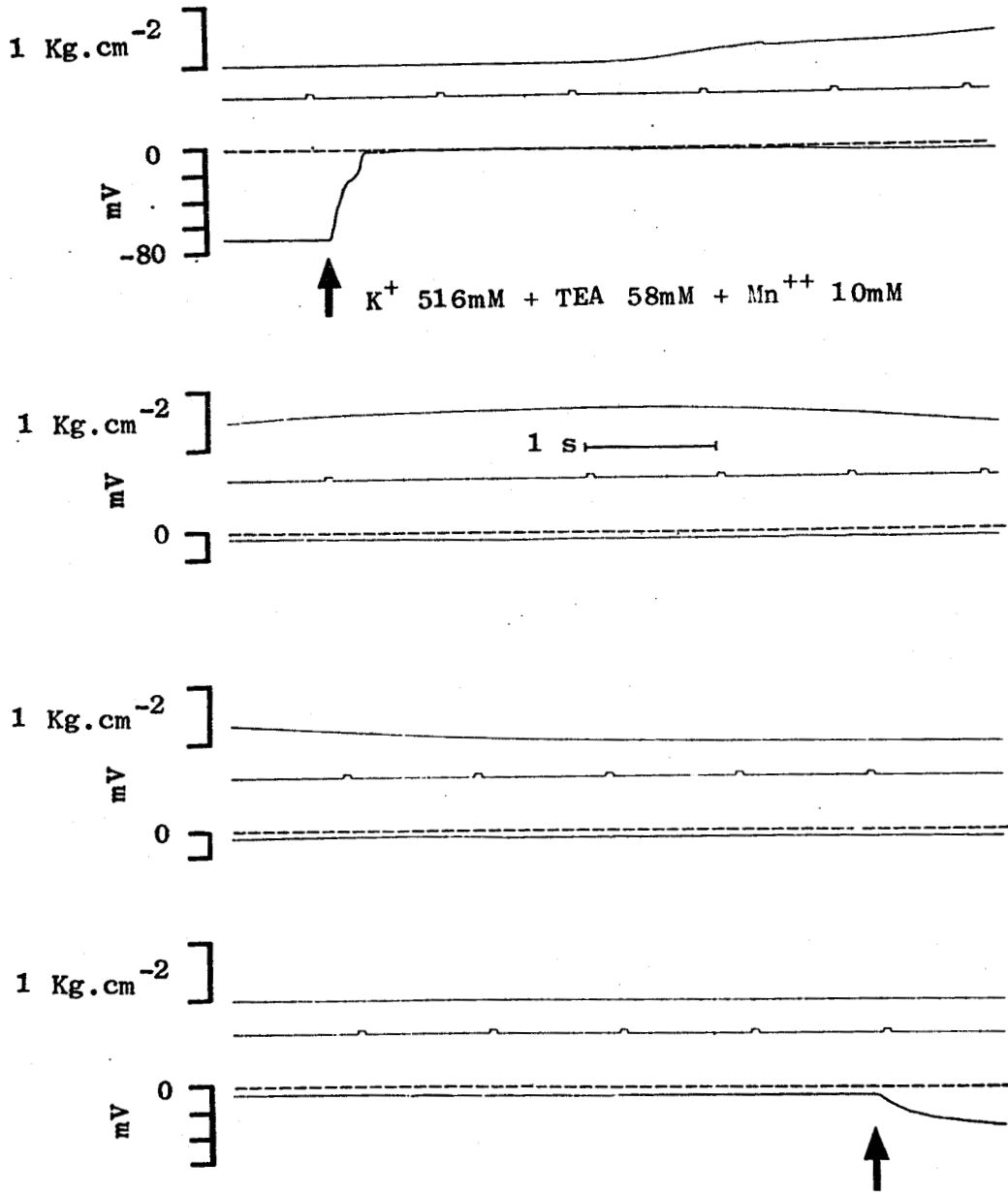


Figure 76

Dépolarisation membranaire et contracture potassique d'une fibre musculaire squelettique isolée de crabe produites par un accroissement soudain de la concentration extracellulaire de  $K^+$  (de 12,9 à 516 mM) en présence de TEA (58 mM), de  $Mn^{++}$  (10 mM), de  $Li^+$  (513 mM) remplaçant les ions  $Na^+$  (reste 2,6 mM sous forme de  $CO_3H^-Na^+$ ) et de  $Sr^{++}$  remplaçant les ions  $Ca^{++}$ .

La concentration en ions du milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA,  $Mn^{++}$  est :  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^+ = 2,6$  mM ;  $Li^+ = 513$  mM ;  $K^+ = 12,9$  mM ;  $Sr^{++} = 11,8$  mM ;  $TEA^+ = 58$  mM ;  $Mn^{++} = 10$  mM ;  $Cl^- = 674,7$  mM ;  $CO_3H^- = 2,6$  mM. L'accroissement de la concentration en  $K^+$  est alors réalisé en remplaçant mM à mM la plus grande partie des ions  $Li^+$  du milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA,  $Mn^{++}$  par des ions  $K^+$ .

Le tracé est présenté en quatre parties. Pour chacune des parties : la trace du haut montre l'évolution de la tension mécanique de contracture ; la trace centrale donne la calibration en temps (1 top toutes les secondes avec absence de trace à la dixième seconde) ; la trace du bas montre l'évolution de la dépolarisation membranaire. La première flèche précise l'instant où la concentration extracellulaire en  $K^+$  est soudainement augmentée (516 mM) après 20 minutes de prétraitement de la fibre dans le milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA,  $Mn^{++}$ , qui fait suite à un prétraitement de la fibre de 40 minutes dans le même milieu  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$  mais dépourvu de TEA et de  $Mn^{++}$ . La seconde flèche précise le retour au milieu de référence  $Li^+$ ,  $Sr^{++}$ , TEA,  $Mn^{++}$ .

## 7 - Conclusion sur le phénomène de contracture

La dépolarisation de la fibre musculaire de crabe, consécutive à l'application d'un milieu hyperpotassique, intervient sur le décours du phénomène mécanique, non seulement par le niveau maximum qu'elle atteint mais aussi par la vitesse avec laquelle ce maximum est atteint. Ainsi, des modifications de l'environnement ionique peuvent aboutir à un niveau de dépolarisation identique alors que l'amplitude et le décours du phénomène mécanique correspondant à la contracture peuvent être très différents. Une importance considérable dans l'environnement ionique peut être attribuée à l'ion  $\text{Ca}^{++}$ . Cet ion est en effet montré responsable de la phase rapide du courant entrant et permet l'activation directe, par son influx, du mécanisme contractile et indirectement par la stimulation de la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par les citernes du R.S., libération inhibée par les ions  $\text{Li}^+$  (nos résultats ; VASSORT, 1973). Il participe également à la seconde composante lente du courant entrant qui n'est pas bloquée par les ions  $\text{Mn}^{++}$ . Cette seconde composante permet quant à elle le développement d'une composante "tonique" de la contracture.

Le phénomène mécanique peut donc être séparé en trois composantes à savoir une première liée à l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  correspondant à la première composante de courant entrant, une seconde liée à l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  correspondant à la seconde composante du courant entrant et une troisième correspondant à la libération du  $\text{Ca}^{++}$  des citernes du R.S., libération qui est activée dès la première composante du phénomène électrique. L'importance de l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  est, de plus, montrée être dépendante de l'environnement ionique, notamment en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Mg}^{++}$ , mais également en  $\text{Cl}^-$ . L'existence d'antagonismes  $\text{Ca}^{++}-\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{++}-\text{Mg}^{++}$  a aussi pu être également vérifiée. Le  $\text{Cl}^-$ , quant à lui, est nécessaire pour le développement d'une contracture normale ; c'est ainsi que le remplacement des ions  $\text{Cl}^-$  par les ions  $\text{NO}_3^-$  aboutit à une forte réduction du phénomène mécanique qui peut s'interpréter par une inhibition de la contraction des myofilaments malgré l'augmentation de leur activité ATPasique (voir chapitres précédents). D'autre part, les ions  $\text{Cl}^-$  constituent l'espèce ionique qui porte la plus grande partie du courant dynamique sortant. L'inhibition de ce courant par le TEA favorise ainsi le développement de phénomène mécanique du fait



d'une dépolarisation plus ample et contribue à une étude plus aisée de la contracture potassique. De plus, l'action connue des ions (anions et cations) tant sur l'activité ATPasique que sur l'activité mécanique propre des myofilaments isolés, permet de faire la part de ce qui revient au système membranaire et de ce qui revient au système myofibrillaire.

Un dernier point doit maintenant être abordé : il concerne le couplage excitation-contraction consécutif à une brève stimulation électrique de la fibre musculaire. Bien que l'étude de ce couplage soit moins aisée dans le cas de la secousse musculaire, elle va être abordée, uniquement dans le cadre des effets des ions divalents  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  pour lesquels un rapport optimal est requis pour le plein développement de la contracture potassique.



ETUDE DE LA SECOUSSE MUSCULAIRE

CHAPITRE V

## I - POSITION DU PROBLÈME ET CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

## II - TECHNIQUES

## III - RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Influence des ions  $\text{Ca}^{++}$
2. Influence des ions  $\text{Mg}^{++}$
3. Conclusion

## I - POSITION DU PROBLÈME ET CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES

L'apparition d'une conductance membranaire au  $\text{Ca}^{++}$  des fibres de crustacés est une phase essentielle du couplage excitation-contraction (GIRARDIER et coll., 1963 ; REUBEN et coll., 1967 ; SUAREZ KURTZ et coll., 1972 ; nos résultats) dans la mesure où l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$  est requise pour le développement du potentiel d'action des fibres musculaires de crustacés (FATT et KATZ, 1953 ; FATT et GINSBORG, 1958 ; HAGIWARA et NAKA, 1964 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a). Au niveau d'un tel couplage intervient également un phénomène important, défini par HILL (1949), qui concerne l'état actif. De l'amplitude et de la durée du P A dépend l'importance de l'état actif et donc l'importance du phénomène mécanique. En effet, une relation étroite liant par ailleurs la durée et l'amplitude de l'état actif à celles du P A, établie par MACPHERSON et WILKIE (1954), laisse entrevoir que la modification du P A, notamment par le changement de l'environnement ionique va modifier parallèlement l'état actif et donc la secousse résultante. Il est de ce fait difficile de bien cerner la relation liant le P A à la secousse. Cependant, l'amplitude du P A est suffisante dans la mesure où sa durée serait relativement importante pour activer au maximum le mécanisme contractile. En effet, le niveau de potentiel atteint au sommet du P A est de fait supérieur à - 10 mV ainsi que l'atteste la figure 77. La zone de potentiel pour laquelle la contracture passe d'une valeur minimale à maximale est en effet comprise entre - 40 et - 18 mV.

Comme les variations de l'environnement ionique modifient profondément le PA (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a ; HAUDECOEUR, 1971, 1975), seuls les effets de variation des concentrations en ions divalents  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  seront étudiés au niveau de la secousse musculaire dans le but de confirmer l'action inhibitrice du  $\text{Mg}^{++}$  sur l'entrée de  $\text{Ca}^{++}$ , nécessaire au développement de la contraction, déjà observée lors de l'étude de la contracture potassique.

## II - TECHNIQUES

La fibre musculaire isolée de crabe est placée dans la même cuve que précédemment (chapitres III et IV). La stimulation électrique est

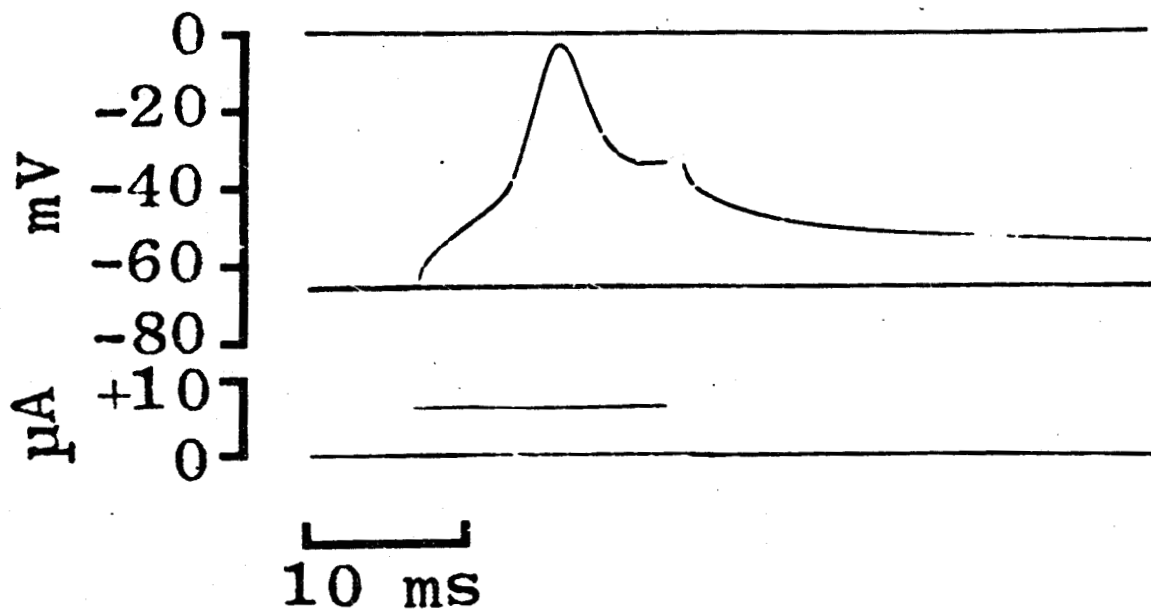


Figure 77

Potentiel d'action, enregistré dans les conditions normales, obtenu par application au niveau de la fibre squelettique de crabe, d'un crêneau de courant dépolarisant.

La concentration en ions de la solution est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ .

La trace supérieure horizontale de l'enregistrement correspond au potentiel 0 de référence.

Tracé publié au *Journal de Physiologie, Paris, 1977, 73, 663-674* par BRULE et coll.

effectuée par l'intermédiaire d'électrodes constituées de plaques d'argent placées de part et d'autre de la fibre de manière à obtenir une stimulation d'ensemble de la préparation. En effet, une stimulation ponctuelle, notamment par microélectrode, déclenche un potentiel d'action qui décroît généralement exponentiellement en fonction de la distance (FATT et KATZ, 1953 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a) témoignant d'une absence de propagation de type autorégénératif en surface à l'inverse de ce qui se passe au niveau de l'axone et de la fibre squelettique de vertébrés. De plus, dans de telles conditions de stimulation d'ensemble, il s'avère impossible, à cause des artéfacts, d'enregistrer simultanément le potentiel de membrane par microélectrode.

Lors de l'étude des effets de milieux de concentrations variées en ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ , les fibres sont préalablement baignées pendant 10 minutes par ces milieux avant d'être soumises aux effets de la stimulation électrique.

### III - RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les fibres musculaires d'invertébrés ne semblent pas "en apparence" répondre à la loi du tout ou rien car la réponse mécanique n'est pas d'emblée maximale (NAGAI, 1953 ; SUGI et KOSAKA, 1964). La force contractile est fonction de l'amplitude et de la durée de la stimulation (SUGI et KOSAKA, 1964 ; EDWARDS et coll., 1964). En ce qui concerne notre préparation, la durée de l'impulsion électrique, appliquée de part et d'autre de la fibre, est choisie égale à 15 ms. Dans ces conditions, la tension de la secousse musculaire résultante croît alors avec l'intensité de la stimulation, alors que la réponse électrique, sur de telles fibres de gros diamètre, est de type tout ou rien (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a ; BRULE et coll., 1977 a). Cette contraction graduée pourrait résulter de la non-propagation autorégénérative du PA en surface, puisque de telles contractions graduées sont enregistrées sur les fibres de grenouille dans le cas où l'activation de la conductance au  $\text{Na}^+$  est éliminée (immersion dans un milieu sans  $\text{Na}^+$ ) (HUXLEY et TAYLOR, 1958 ; WATANABE, 1958 ; voir SUGI et KOSAKA, 1964). Cependant, d'autres phénomènes peuvent intervenir, à savoir, d'une part l'existence d'un léger phénomène d'escalier (BRULE et coll., 1970 ; BRULE, 1972), d'autre part la présence chez cette fibre d'une poly-innervation (synapses excitatrices et inhibitrices). L'existence de cette réponse musculaire graduée est illustrée à la figure 78. La figure 79 montre les phases de contraction et de relâchement lors de la secousse maximale pour une durée de choc de 15 ms. Dans ce cas, la tension enregistrée est de  $0,2 \text{ Kg.cm}^{-2}$  alors que lors de la contracture potassique (phénomène bien plus durable), dans les conditions physiologiques normales, la tension moyenne est de  $2,7 \text{ Kg.cm}^{-2}$ .

Pour chaque fibre testée en solution anormale, la tension maximale de référence, développée lors de la secousse, correspond à celle enregistrée pour une durée de choc de 15 ms et une intensité correspondant au



plateau de tension (Fig. 78) ; les fibres sont stimulées à la fréquence de 0,1 cycle/s.

Figure 78

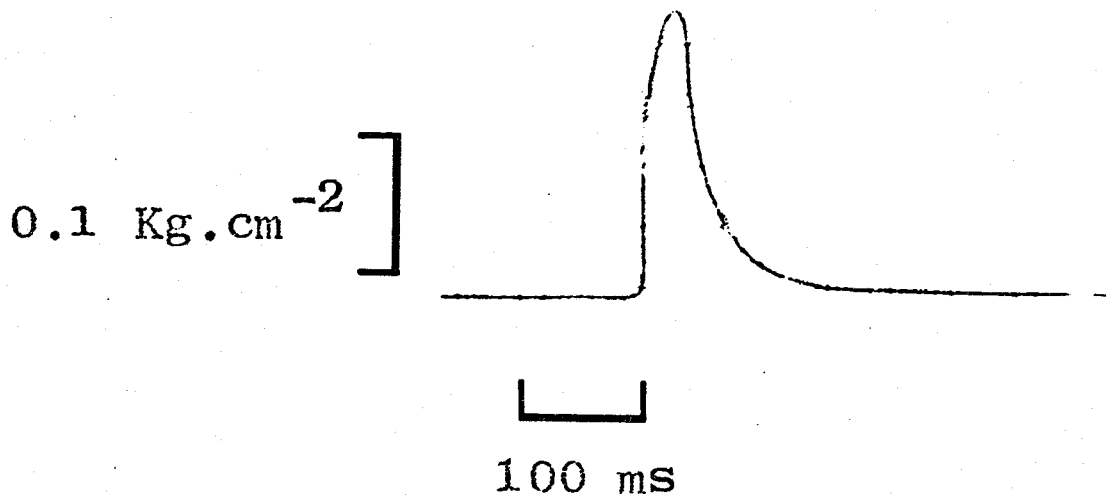
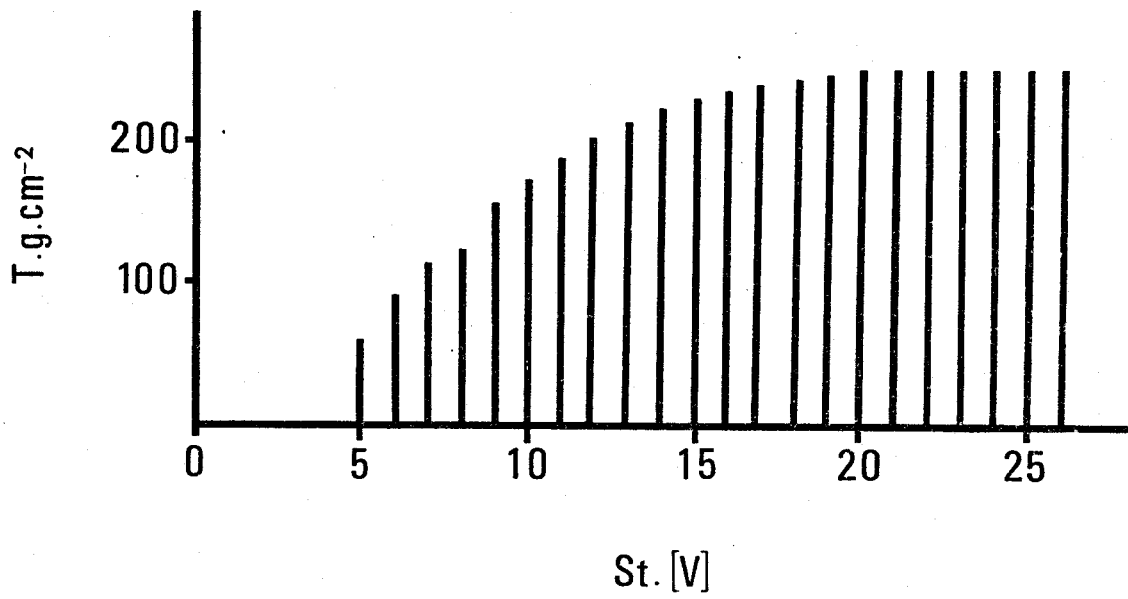
Tension mécanique développée par une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, exprimée en  $\text{g.cm}^{-2}$ , lors de secousses en fonction de la stimulation (exprimée par la tension électrique appliquée au niveau des électrodes situées de part et d'autre de la fibre).

Chaque trait vertical représente l'enregistrement d'une secousse musculaire. La durée du choc de stimulation est de 15 ms et la fréquence de 0,1 cycle/seconde.

Figure 79

Exemple d'enregistrement, dans les conditions normales, de la secousse musculaire maximale développée par la fibre squelettique de crabe soumise à un créneau de stimulation d'une durée de 15 ms.

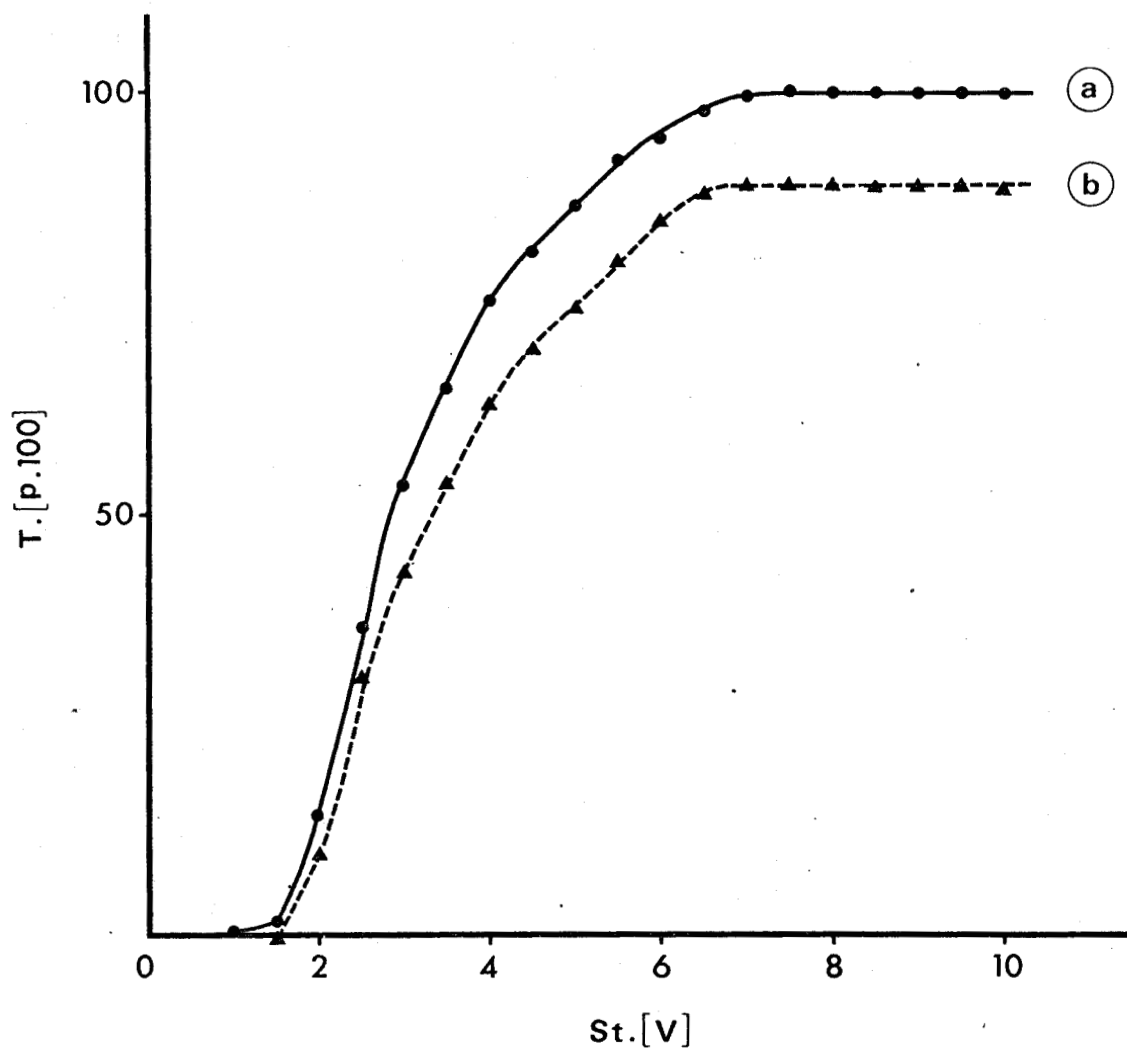
L'enregistrement est obtenu sur un enregistreur à plume, curvilinéaire, type SEFRAM.





### 1 - Influence des ions $\text{Ca}^{++}$

Les figures 80 et 81 montrent respectivement les effets de milieu pauvre et riche en  $\text{Ca}^{++}$  sur l'amplitude de la secousse en fonction de l'intensité de stimulation. Ainsi, un appauvrissement d'un quart de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  diminue faiblement la tension maximale de contraction. Le seuil d'intensité de stimulation permettant le développement de la secousse n'est sensiblement pas modifié (Fig. 80), comme il en est par ailleurs de même pour le milieu très enrichi en  $\text{Ca}^{++}$  (4 fois la concentration extracellulaire normale). Cependant, dans ces dernières conditions, la tension mécanique maximale de la secousse a considérablement



augmenté, d'environ 65 p. 100 (Fig. 81). Les résultats correspondants aux différents milieux de concentration variée en ions  $\text{Ca}^{++}$  sont traduits par la courbe exprimant l'évolution de la tension mécanique maximale de contraction en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  (Fig. 82). La tension maximale de référence (100 p. 100) correspond à celle enregistrée pour un environnement ionique en  $\text{Ca}^{++}$  normal. Il est à noter que la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire aboutit à la suppression de la secousse musculaire alors qu'au niveau de la fibre squelettique de vertébrés, l'absence de  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire n'entraîne pas l'annulation de la secousse (SANDOW et coll., 1975 ; ENDO, 1977). Par contre, en ce qui concerne la fibre musculaire de crabe, la disparition de la secousse n'est pas pour surprendre dans la mesure où, également sur la fibre de crabe, HAUDECOEUR et GUILBAULT (1972 a) observent la disparition du PA en absence de  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire. De même, l'enrichissement du milieu extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$ , conduit à une augmentation de l'amplitude du PA à un accroissement de l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a) qui rend donc compte du renforcement de la secousse observé. Cependant la chute de tension constatée au-delà d'une concentration externe en  $\text{Ca}^{++}$  de 10 fois la normale ne peut, semble-t-il, être imputable à l'accroissement de la pression osmotique du milieu dans la mesure où un plus fort accroissement de

### Figure 80

*Tension mécanique développée par une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de secousse en fonction de la tension de stimulation appliquée au niveau des électrodes situées de part et d'autre de la fibre.*

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire obtenue en milieu de référence @ dont la concentration en ions est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . La courbe ⓐ est obtenue en milieu de concentration différente en  $\text{Ca}^{++}$  (8,85 mM) après un prétraitement de la fibre de 10 minutes dans ce milieu. La réduction de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu de référence du  $\text{CaCl}_2$  (le maintien de la concentration en  $\text{Cl}^-$  est obtenu par apport convenable de chlorhydrate de choline).

La fibre est stimulée par des chocs d'une durée de 15 ms, à une fréquence de 0,1 cycle/seconde.

pression osmotique permet le maintien de la tension comme cela va être montré (Fig. 86).

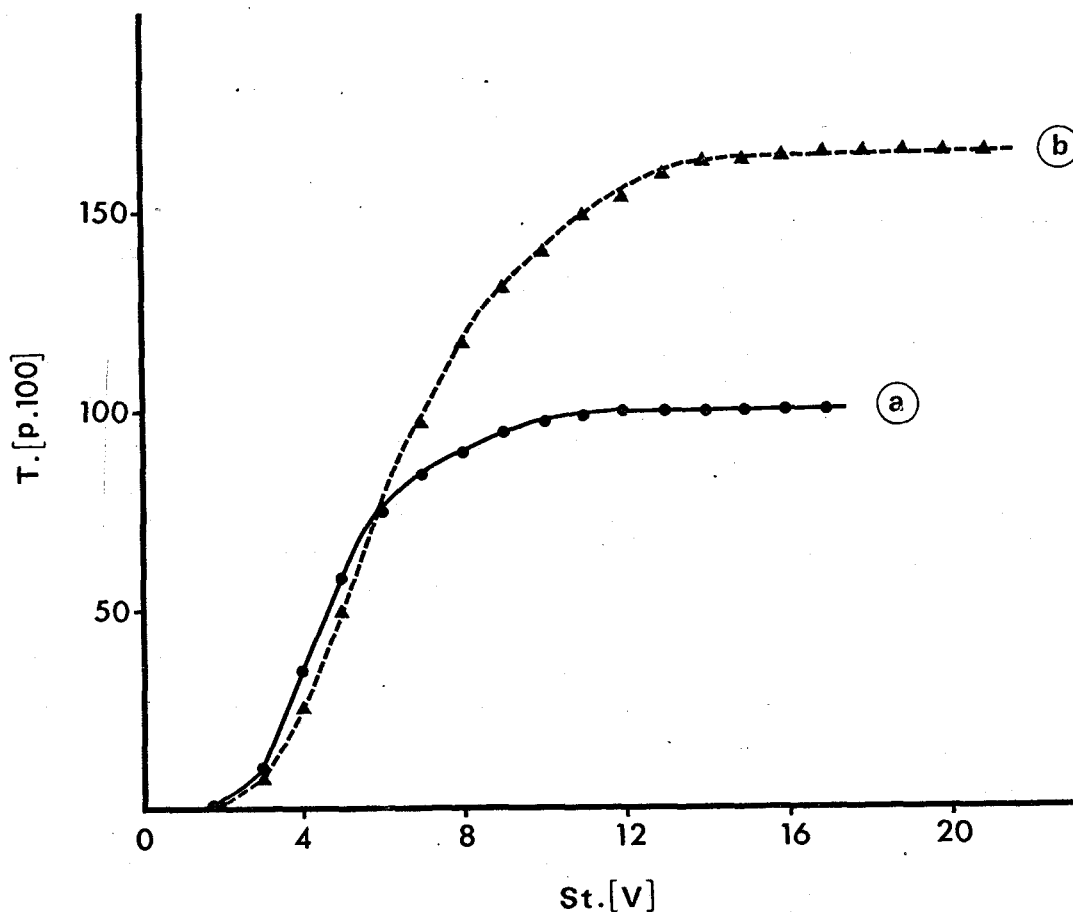


Figure 81

Tension mécanique développée par une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de la secousse en fonction de la tension de stimulation appliquée au niveau des électrodes situées de part et d'autre de la fibre.

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire obtenue en milieu de référence (a) dont la concentration en ions est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . La courbe (b) est obtenue en milieu de concentration différente en  $\text{Ca}^{++}$  (47,2 mM) après un prétraitement de la fibre de 10 minutes dans ce milieu. L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ .

La fibre est stimulée par des chocs d'une durée de 15 ms, à une fréquence de 0,1 cycle/seconde.

Lors de cette étude des effets du  $\text{Ca}^{++}$ , l'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de propionate. Dans de telles conditions, les très faibles modifications de force ionique et de tonicité des milieux ne peuvent cependant pas expliquer les variations de tension observées.

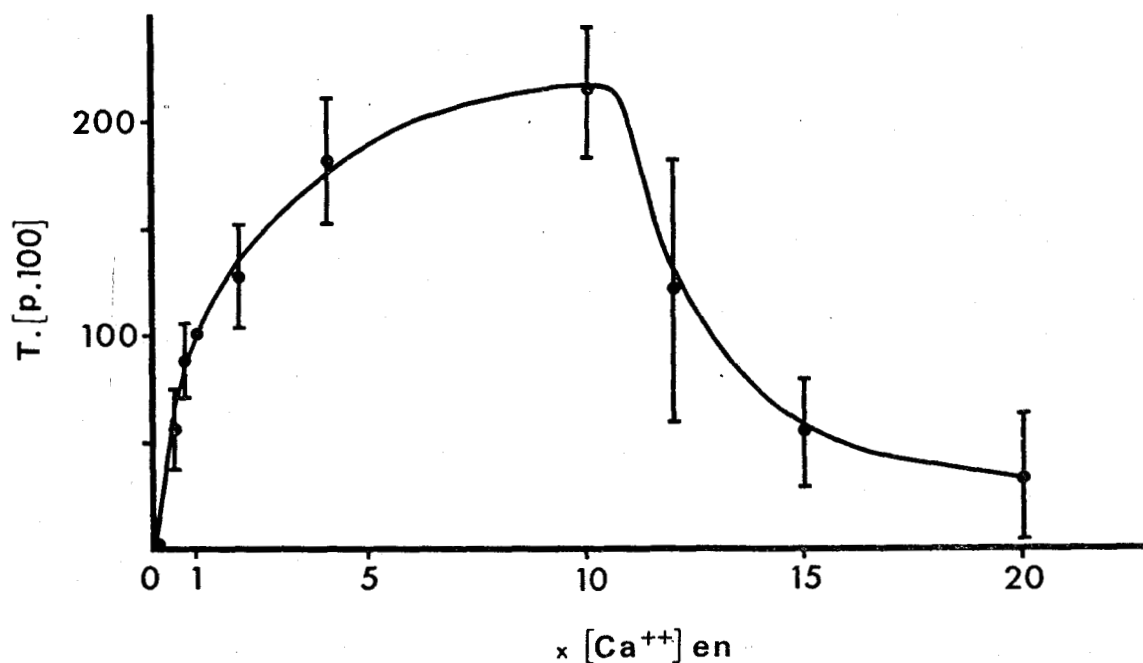


Figure 82

Tension mécanique maximale moyenne développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de secousse en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$ .

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire en milieu de référence dont la concentration en ions est :  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$  et  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$ .

La concentration extracellulaire normale (e n) en  $\text{Ca}^{++}$  est représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. La réduction de la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu du  $\text{CaCl}_2$  (le maintien de la concentration en  $\text{Cl}^-$  est obtenu par apport convenable de chlorhydrate de choline pour chaque milieu testé). L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est quant à lui réalisé sous forme de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ . La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 8$ ).

## 2 - Influence des ions $Mg^{++}$

Tout comme pour les ions  $Ca^{++}$ , les effets de la variation de la concentration extracellulaire en  $Mg^{++}$  sont étudiés. Au niveau de la contraction potassique, le  $Mg^{++}$  était présenté comme un ion intervenant sur la conductance dynamique au  $Ca^{++}$  ; un milieu enrichi en  $Mg^{++}$  inhibe l'activation de la conductance dynamique au  $Ca^{++}$  de la membrane. De ce fait, les ions  $Mg^{++}$ , modifiant la conductance calcique et par conséquent l'influx de  $Ca^{++}$ , doivent donc également modifier la réponse mécanique. Les figures 83 et 84 donnent deux exemples concernant la variation de l'amplitude de la secousse musculaire en fonction de la stimulation en milieu pauvre en  $Mg^{++}$  (1/4) et riche (x 2). En milieu appauvri en ions  $Mg^{++}$  la tension mécanique de la secousse est accrue. Là encore, comme pour les ions  $Ca^{++}$ , l'accroissement de tension peut également être interprété par la modification du potentiel d'action qui présente, en milieu pauvre en  $Mg^{++}$ , une vitesse de phase ascendante beaucoup plus grande (HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 b ; HAUDECOEUR et coll., 1972) bien que l'amplitude du potentiel d'action paraisse indépendante de la concentration extracellulaire en  $Mg^{++}$  (FATT et GINSBORG, 1958 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 b). De plus, les effets inhibiteurs du  $Mg^{++}$  sur la conductance au  $Ca^{++}$  se manifestent par une modification du seuil d'intensité minimale d'apparition de la secousse mécanique

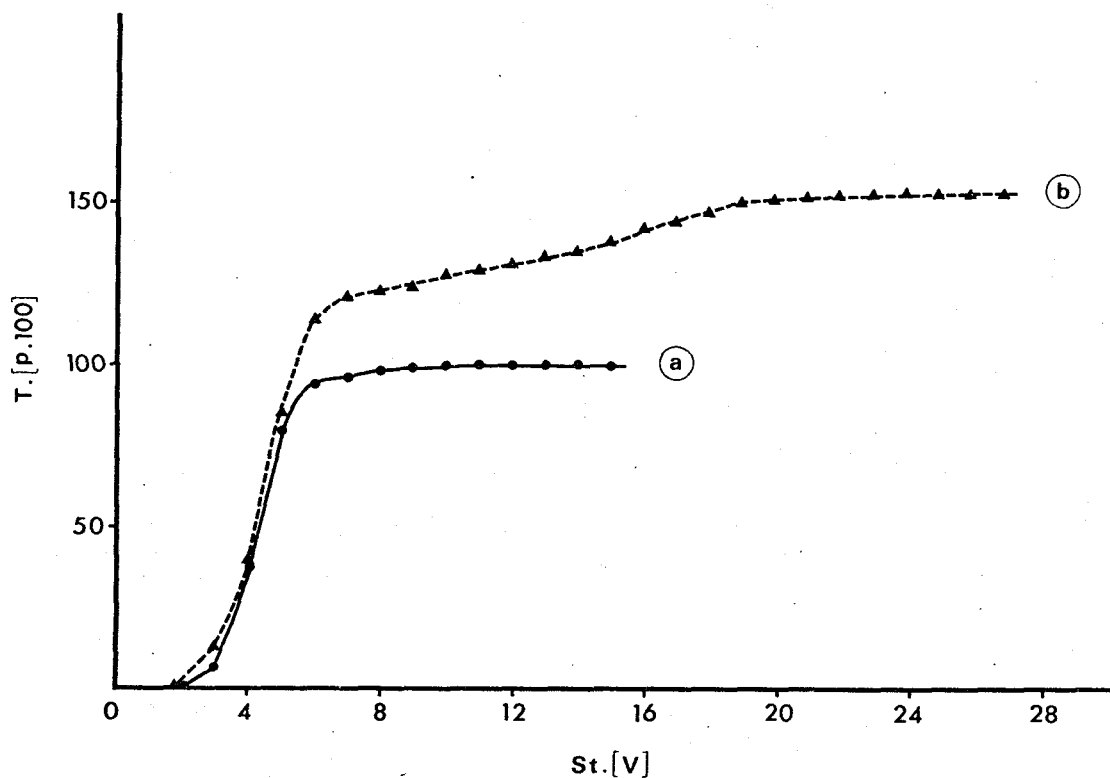
### Figure 83

*Tension mécanique développée par une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de secousse en fonction de la tension de stimulation appliquée au niveau des électrodes situées de part et d'autre de la fibre.*

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire obtenue en milieu de référence @ dont la concentration en ions est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Mg^{++} = 23,6$  mM ;  $Na^{+} = 515,6$  mM ;  $K^{+} = 12,9$  mM ;  $Cl^{-} = 596,7$  mM ;  $CO_3H^{-} = 2,6$  mM. La courbe ⑥ est obtenue en milieu de concentration différente en  $Mg^{++}$  (5,9 mM) après un prétraitement de la fibre de 10 minutes dans ce milieu. La réduction de la concentration en  $Mg^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu de référence du  $MgCl_2$  (le maintien de la concentration en  $Cl^{-}$  est obtenu par apport convenable de chlorhydrate de choline).

La fibre est stimulée par des chocs d'une durée de 15 ms, à une fréquence de 0,1 cycle/seconde.

(Figs 83 et 84). La figure 85, résumant les effets des différents milieux testés, montre que la tension mécanique maximale de la secousse est obtenue lorsque la concentration extracellulaire en  $Mg^{++}$  est réduite entre 1/4 et 1/10 de sa valeur de référence ; tout accroissement de la concentration en  $Mg^{++}$  extracellulaire aboutit à une réduction de la tension mécanique. Il semble bien que le  $Mg^{++}$  agisse comme un frein vis-à-vis de l'entrée de  $Ca^{++}$ . Dans de telles conditions, le maintien du rapport des concentrations extracellulaires des ions  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$ , à sa valeur de référence, devrait aboutir tout comme pour les concentractures potassiques (Fig. 46) à un maintien de l'amplitude de la secousse. La figure 86 montre en effet qu'il en est bien ainsi. Ce phénomène correspond là encore à ce qui est observé par HAUDECOEUR et GUILBAULT (1972 b) : ils montrent que l'accroissement simultané du  $Ca^{++}$  et du  $Mg^{++}$  en maintenant constant le rapport de leur concentration à la valeur de référence conduit à l'absence d'effet sur le PA.



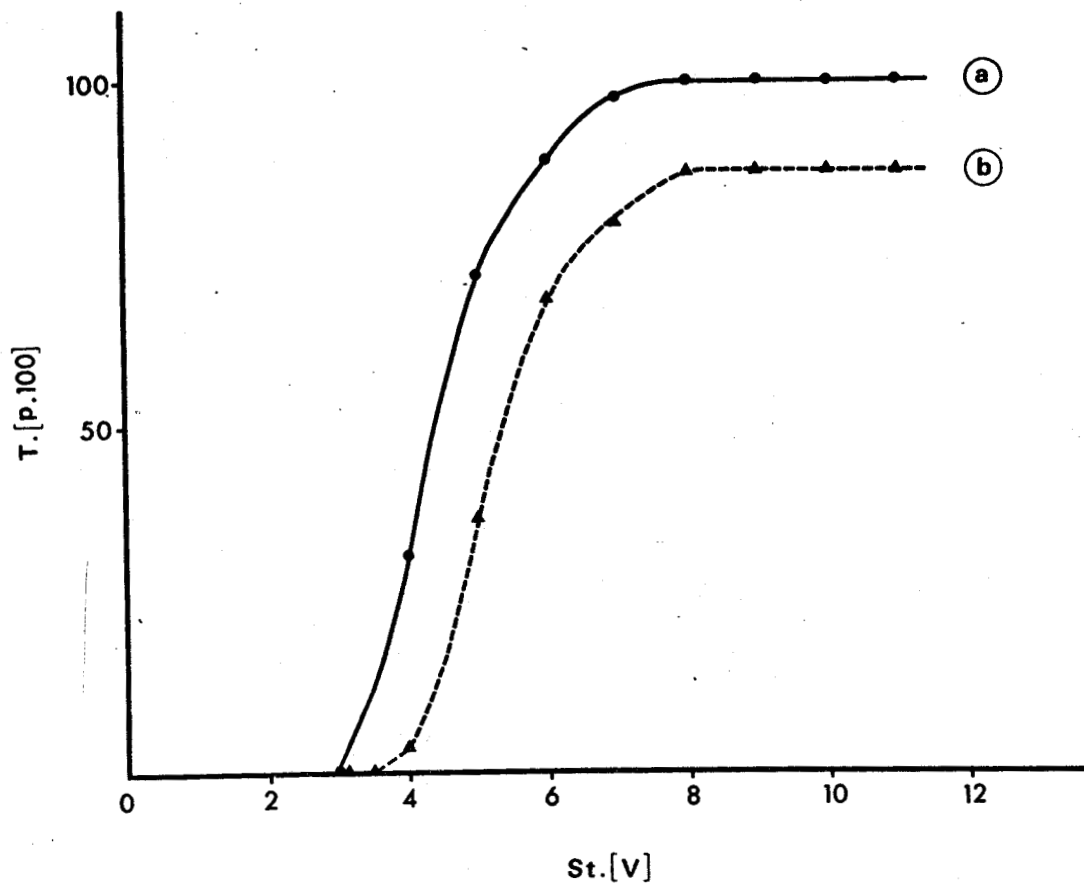


Figure 84

Tension mécanique développée par une fibre musculaire squelettique isolée de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de secousse en fonction de la tension de stimulation appliquée au niveau des électrodes situées de part et d'autre de la fibre.

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire obtenue en milieu de référence (a) dont la concentration en ions est :  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$  ;  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$  ;  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$ . La courbe (b) est obtenue en milieu de concentration différente en  $\text{Mg}^{++}$  (47,2 mM) après un prétraitement de la fibre de 10 minutes dans ce milieu. L'apport de  $\text{Mg}^{++}$  est réalisé sous forme de  $\text{SO}_4^{--}$ .

La fibre est stimulée par des chocs d'une durée de 15 ms, à une fréquence de 0,1 cycle/seconde.

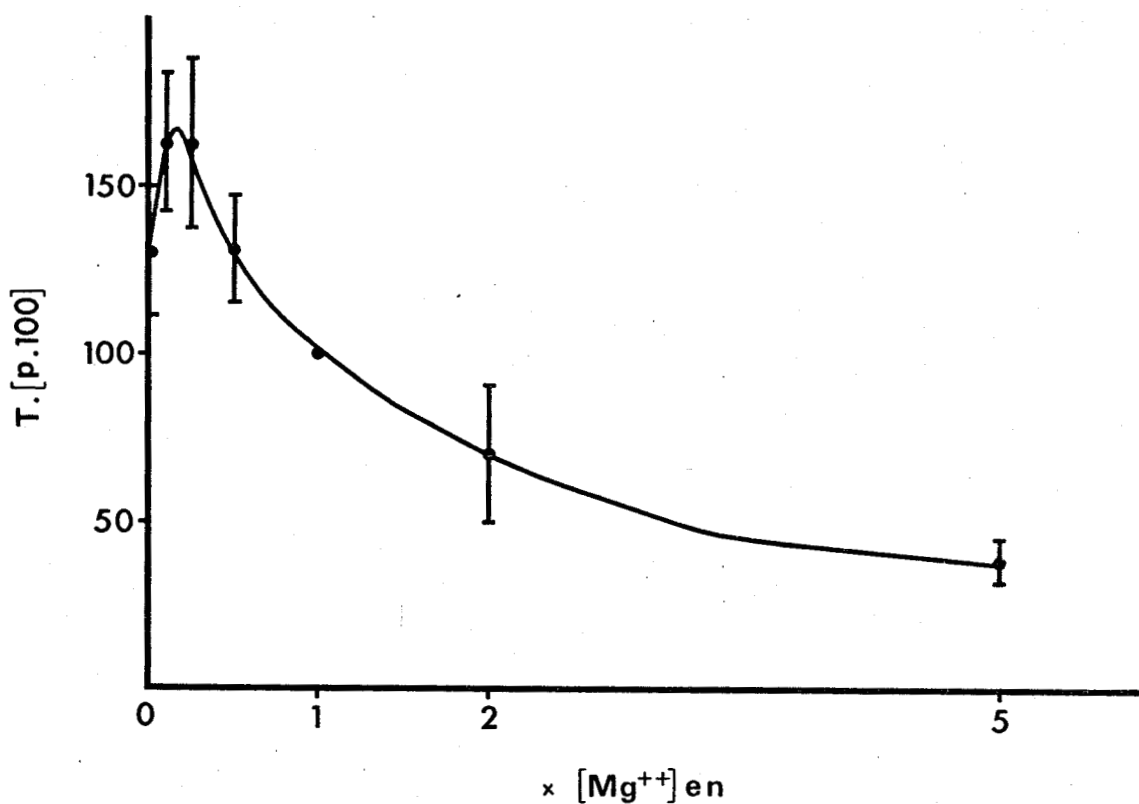


Figure 85

Tension mécanique maximale moyenne développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de secousse en fonction de la concentration extracellulaire en  $Mg^{++}$ .

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire en milieu de référence dont la concentration en ions est :  $Ca^{++} = 11,8$  mM ;  $Na^{+} = 515,6$  mM ;  $K^{+} = 12,9$  mM ;  $Cl^{-} = 596,7$  mM ;  $CO_3H^{-} = 2,6$  mM et  $Mg^{++} = 23,6$  mM. La concentration extracellulaire normale (e n) en  $Mg^{++}$  est représentée sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. La réduction de la concentration en  $Mg^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu du  $MgCl_2$  (le maintien de la concentration en  $Cl^{-}$  est obtenu par apport convenable de chlorhydrate de choline pour chaque milieu testé). L'apport de  $Mg^{++}$  est quant à lui réalisé sous forme de  $SO_4^{--}$ . La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 8$ ).



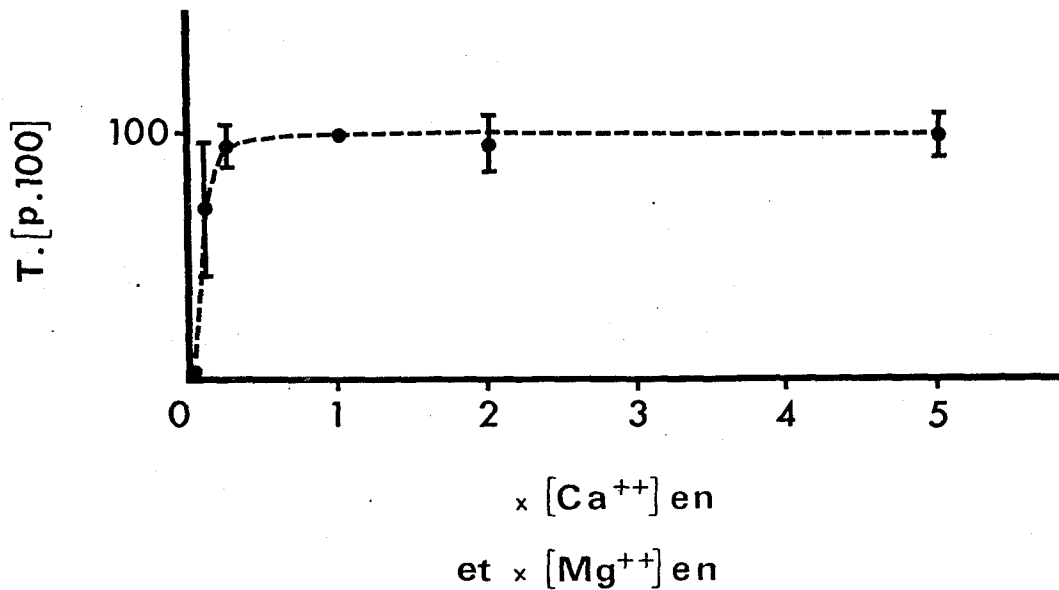


Figure 86

Tension mécanique maximale développée par des fibres musculaires squelettiques isolées de crabe, exprimée en unités arbitraires (p.100), lors de secousse en fonction de la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  (maintien du rapport des concentrations de  $\text{Ca}^{++}$  et de  $\text{Mg}^{++}$  à la valeur de référence, soit  $11,8/23,6 = 0,5$ ).

La valeur 100 p.100 correspond à la tension maximale de la secousse musculaire en milieu de référence dont la concentration est :  $\text{Na}^+ = 515,6 \text{ mM}$  ;  $\text{K}^+ = 12,9 \text{ mM}$  ;  $\text{Cl}^- = 596,7 \text{ mM}$  ;  $\text{CO}_3\text{H}^- = 2,6 \text{ mM}$  ; et  $\text{Ca}^{++} = 11,8 \text{ mM}$ ,  $\text{Mg}^{++} = 23,6 \text{ mM}$ . Les concentrations extracellulaires normales (e n) en  $\text{Ca}^{++}$  et en  $\text{Mg}^{++}$  sont représentées sur la courbe par le point dont l'abscisse est 1. La réduction des concentrations en  $\text{Ca}^{++}$  et en  $\text{Mg}^{++}$  est réalisée en soustrayant au milieu du  $\text{CaCl}_2$  et du  $\text{MgCl}_2$  (le maintien de la concentration en  $\text{Cl}^-$  est obtenu par apport convenable de chlorhydrate de choline pour chaque milieu testé). L'apport de  $\text{Ca}^{++}$  est réalisé sous forme de  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$ , celui de  $\text{Mg}^{++}$  sous forme de  $\text{SO}_4^{--}$ . La fibre est au préalable prétraitée, pendant 10 minutes, dans chaque milieu testé.

Chaque point de la courbe représente  $m \pm \sigma$  ( $n = 8$ ).

Ainsi, si l'accroissement de la concentration en  $Mg^{++}$  entraîne, comme cela vient d'être précisé, une diminution de la tension de la secousse, par contre, l'accroissement simultanément en ions  $Ca^{++}$ , dans les mêmes proportions, permet son maintien. Il en est par ailleurs de même lors de la réduction au 1/4 des valeurs de référence des concentrations en  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$ . Pour des diminutions plus importantes en ions  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$ , la tension de référence n'est pas maintenue, fait lié semble-t-il à un fort appauvrissement de la concentration intracellulaire du  $Mg^{++}$  qui conduit à une contraction plus faible des myofilaments et à une diminution de leur activité ATPasique (chapitres précédents). Cette annulation ou sa diminution est également liée, indépendamment des effets du  $Mg^{++}$ , à l'absence ou à l'entrée trop faible de  $Ca^{++}$ .

### 3 - Conclusion

Les résultats concernant les effets des ions divalents, sur le secousse, sont en bon accord avec ceux obtenus lors de l'étude de la contracture potassique. L'existence d'une régulation de l'influx de  $Ca^{++}$ , nécessaire au raccourcissement myofibrillaire, par le  $Mg^{++}$  extracellulaire, se trouve ainsi confirmée et, seul le maintien d'un rapport de concentrations permet l'enregistrement de secousses musculaires d'égales amplitudes.



CONCLUSION GENERALE

I - ACTIVITÉ ATPASIQUE

II - CONTRACTION DES MYOFILAMENTS

III - CONTRACTURE

L'étude du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire striée de crabe a conduit à l'analyse de l'activité ATPasique des protéines de structure de cette préparation et a révélé une corrélation parfaite avec la contraction de ces myofilaments isolés, dès l'instant où les ions  $\text{Cl}^-$  sont présents dans l'environnement ionique. Si, au niveau de l'activité ATPasique, l'hydrolyse de l'ATP par les protéines de structure est considérablement accrue en absence totale de  $\text{Cl}^-$ , c'est-à-dire en présence de sulfate, de méthylsulfate ou de nitrate, l'énergie supplémentaire libérée n'est pas utilisée pour le phénomène mécanique ; la contraction résultante des myofilaments isolés est en effet beaucoup plus faible en absence de  $\text{Cl}^-$ . Ainsi, les ions  $\text{Cl}^-$  semblent constituer un maillon indispensable pour le bon "fonctionnement mécanique" des myofilaments.

## I - ACTIVITÉ ATPASIQUE

En ce qui concerne l'activité ATPasique, des concentrations optimales ont été mises en évidence pour les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  ainsi que pour le substrat : l'ATP. En effet, la quantité de substrat nécessaire pour obtenir une activité ATPasique maximale est de 2 mM bien que la diminution de cette activité ATPasique, pouvant résulter d'une inhibition par excès de substrat, pour des concentrations supérieures (3 et 4 mM) en ATP ne soit pas très importante. De fait, au niveau des myofibrilles de crabe, DE VILLAFRANCA (1967) enregistre un maximum d'activité, suivant les milieux, pour des teneurs en substrat comprises entre 2 et 6 mM. Il est toutefois bien connu que de hautes concentrations en substrat inhibent l'"ATPase myofibrillaire" indépendamment de la présence d'ions activateurs divalents (PERRY et GREY, 1956 ; FINKEL et GERGELY, 1961 ; DE VILLAFRANCA, 1967). De la même manière, un optimum de concentration est observé pour les ions  $\text{Ca}^{++}$  (PORTZEL et coll., 1969). Au niveau de notre préparation de myofibrilles isolées de crabe, l'activité ATPasique, mesurée par la quantité de  $\text{P}_i$  libéré, s'accroît avec la concentration en ions  $\text{Ca}^{++}$  du milieu environnant jusqu'à ce que cette dernière atteigne une valeur de 1 mM. Au delà, l'activité ATPasique diminue. De façon similaire, l'environnement en ions  $\text{Mg}^{++}$  est très important et un optimum est également révélé. L'activité ATPasique croît sensiblement jusqu'à une concentration en  $\text{Mg}^{++}$  de 1 mM, se maintient jusqu'à 3 mM, diminue très légèrement jusqu'à 7 mM, puis au delà, une



inhibition beaucoup plus importante est observée. De fait, une légère activation de l'"ATPase myofibrillaire" par le  $Mg^{++}$  (concentration faible) peut donc être observée en présence de  $Ca^{++}$ .

Au niveau de l'"ATPase myofibrillaire", ces ions divalents ne sont cependant pas seuls à intervenir puisque la présence ou non d'ions monovalents ( $Na^+$  et  $K^+$ ) modifie de façon considérable l'activité ATPasique des myofibrilles de crabe. Déjà en 1973, FENNER et coll. avaient montré que, sur la myosine myocardique purifiée, l'activité ATPasique était inhibée par addition de  $Na^+$  en présence de  $K^+$  ou de  $Ca^{++}$ , ces deux derniers, pris séparément, étant des cations activateurs de la préparation considérée. De même pour les myofibrilles de crabe, la suppression ou la réduction, du milieu de référence (en présence de  $Ca^{++}$  et de  $Mg^{++}$ ), des ions  $Na^+$  ou des ions  $K^+$  provoque un renforcement de l'activité ATPasique. La réduction simultanée de ces deux ions qui malheureusement a été effectuée avec une légère réduction de la concentration en  $Cl^-$  du milieu environnant (précipité avec le chlorhydrate de choline) a conduit, également, à un renforcement de l'activité ATPasique. Toutefois, dans cette dernière condition, la concentration en  $Cl^-$  est passée de 76 à 50 mM et, cette variation seule des anions, comme cela a été constaté, ne modifie que très faiblement l'activité ATPasique. Cependant, l'anion d'accompagnement a une importance considérable, loin d'être négligeable. L'activité ATPasique est en effet augmentée réversiblement lorsque tous les ions  $Cl^-$  de la solution sont remplacés par des ions méthylsulfate ou sulfate. La possibilité de considérer l'ion  $Cl^-$  comme régulateur peut donc être envisagée dès à présent dans la mesure où la variation de sa concentration de 50 à 106 mM ne modifie, par contre, quasiment pas l'activité ATPasique. Quoiqu'il en soit, un premier schéma (Fig. 87) peut dès lors résumer l'ensemble de ces effets ioniques au niveau de l'activité ATPasique des protéines de structure. Ce schéma simplifié pourra par la suite s'intégrer aux autres concernant la contraction des myofilaments et celle de la fibre intacte pour aboutir à un schéma cybernétique du couplage excitation-contraction de cette préparation.

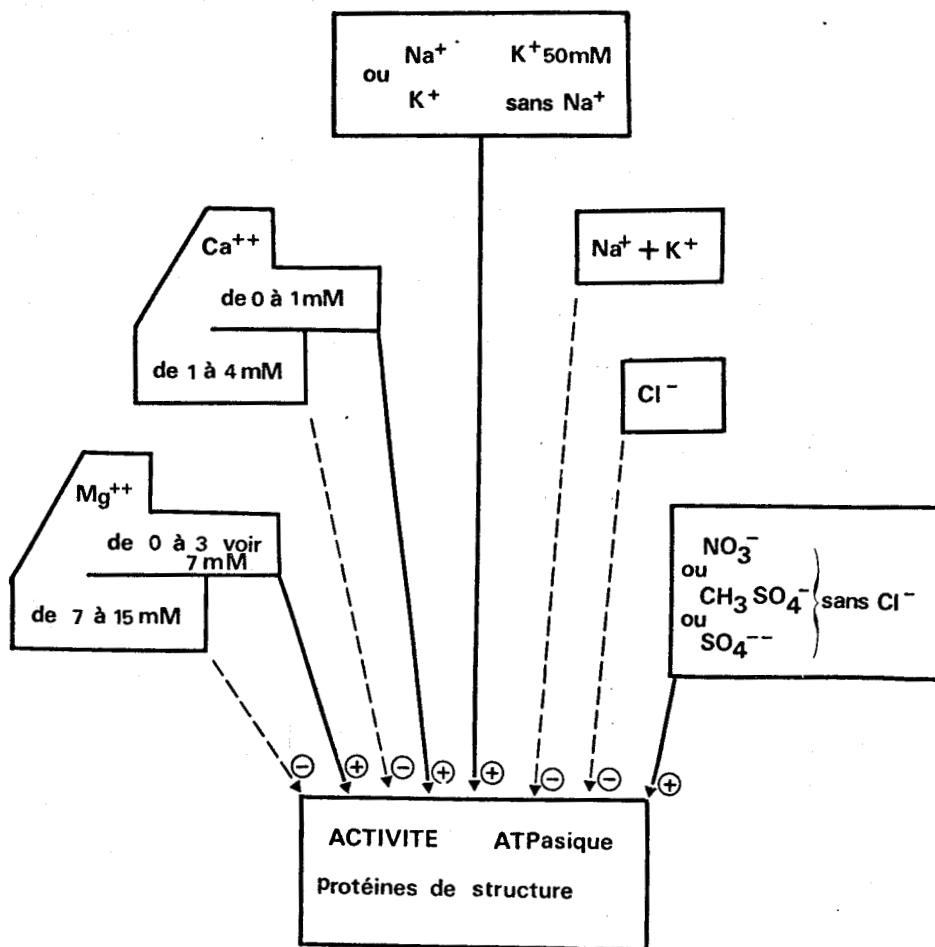


Figure 87

Activité ATPasique des protéines de structure en fonction de l'environnement ionique.

Les flèches en trait plein notées par un signe ⊕ représentent un effet positif de l'ion sur l'activité ATPasique alors que les flèches en pointillés notées par un signe ⊖ représentent un effet négatif. La présence des deux types de flèches pour les ions Ca<sup>++</sup> et Mg<sup>++</sup> montrent l'existence d'un optimum de concentration.

## II - CONTRACTION DES MYOFILAMENTS

Une bonne corrélation (Fig. 38) entre l'activité ATPasique de ces protéines de structure et la contraction des myofilaments, tels qu'ils sont

obtenus après destruction des systèmes membranaires (Figs 21 et 22), existe dès l'instant où les ions  $\text{Cl}^-$  se trouvent présents dans le milieu. Les mêmes optima de concentrations, ou des valeurs proches, sont obtenus pour les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  pour la contraction des myofilaments tout comme pour leur activité ATPasique. Toutefois, il existe au niveau de la contraction une interdépendance entre les concentrations respectives en  $\text{Ca}^{++}$  et en  $\text{Mg}^{++}$ . En effet, pour des concentrations relativement basses en  $\text{Mg}^{++}$  (1 et 3 mM), la concentration en  $\text{Ca}^{++}$  peut être augmentée fortement au-dessus de la valeur de 1 mM sans pour autant inhiber la contraction résultante des myofilaments ; la tension est maintenue à une valeur maximale pour la concentration considérée en  $\text{Ca}^{++}$  et se trouve être proche de  $2 \text{ Kg.cm}^{-2}$ . Par contre, pour des concentrations supérieures en  $\text{Mg}^{++}$  (7, 10 et 15 mM), une concentration optimale de 1 mM de  $\text{Ca}^{++}$  est observée. La tension maximale alors enregistrée l'est pour des valeurs de concentration en  $\text{Mg}^{++}$  de 3 et 7 mM (valeurs comparables à celles qui permettent la meilleure activité ATPasique).

Si les ions divalents présentent des concentrations optimales pour l'obtention d'une tension mécanique maximale, il faut préciser que, dans ces "conditions maximales", la tension peut cependant être renforcée dans la mesure où l'une ou l'autre des espèces ioniques  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  est absente du milieu. En effet, dans ces conditions, une tension de  $4 \text{ Kg.cm}^{-2}$  peut être obtenue. De façon similaire, un renforcement de la tension mécanique des fibres glycélinées en présence d'une concentration déterminée de  $\text{Mg}^{++}$  a par ailleurs déjà été observée par BOWEN et MANDELKERN (1970) avec un seul cation monovalent ( $\text{K}^+$ ). Cependant en ce qui concerne la fibre de crabe la suppression à la fois du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{K}^+$  aboutit à une légère diminution de la tension de contraction. D'autre part, les modifications corrélatives de la force ionique ainsi que de l'activité des ions  $\text{Ca}^{++}$  (calculée à partir de la relation de DEBYE-HÜCKEL) lors des variations de concentrations en cations monovalents ne semblent pas pouvoir expliquer à elles seules les différences enregistrées au niveau des tensions mécaniques. Par ailleurs, le remplacement de ces ions monovalents,  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ , par d'autres, tels que  $\text{Li}^+$  ou  $\text{Rb}^+$  permettant ainsi le maintien de la force ionique aboutit à des résultats différents et confirme le rôle propre de ces cations monovalents  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Si pour l'ensemble de ces résultats, il existe une grande similitude entre activité ATPasique et contraction, il



en est tout autrement en ce qui concerne l'absence de  $\text{Cl}^-$ . En effet, la suppression des ions  $\text{Cl}^-$  de la solution, et leur remplacement par des ions nitrate, méthylsulfate ou sulfate conduit dans tous les cas à une inhibition de la contraction des myofilaments, tendant à faire des ions  $\text{Cl}^-$  un maillon indispensable pour un meilleur couplage mécano-chimique. Un schéma (Fig. 88) liant l'activité ATPasique à la contraction a pu être établi en y incluant une part prépondérante et positive à l'ion  $\text{Cl}^-$  au niveau d'un maillon (résultant peut être d'une modification dans la conformation moléculaire) entre l'activité ATPasique et la contraction des myofilaments permettant un meilleur transfert de l'énergie chimique en énergie mécanique.

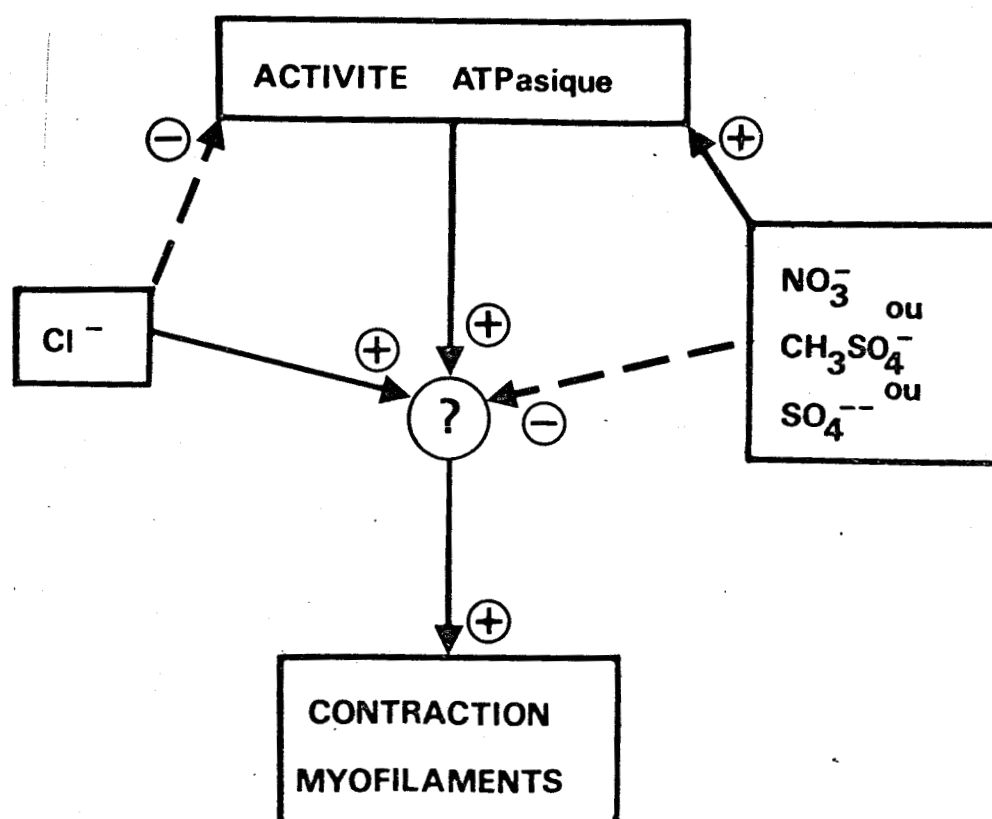


Figure 88

Corrélation entre activité ATPasique et contraction des myofilaments.

L'activité ATPasique exerce un effet positif sur la contraction des myofilaments dès l'instant où le  $\text{Cl}^-$  est présent dans le milieu. L'existence présumée d'un maillon entre activité ATPasique et contraction est représentée par un point d'interrogation sur lequel l'absence d'ions  $\text{Cl}^-$  (milieu nitrate, méthylsulfate, sulfate) se manifeste par un effet négatif.

Enfin, au cours de cette étude concernant la contraction des myofilaments, il a toujours été constaté une "rupture" des myofilaments à des endroits variés selon la préparation et, il n'a pas été ainsi possible de faire agir successivement plusieurs milieux de concentrations différentes sur la même préparation. Le fait que lors de la préparation des myofilaments isolés ces derniers se trouvent pendant un court instant (2 mn) au contact d'un milieu dépourvu d'ATP n'explique pas cette "rupture" de la préparation puisque l'addition d'ATP à toutes les solutions correspondantes aux différentes étapes nécessaires à l'obtention de ces myofilaments n'empêche pas la "rupture". De fait, cette rupture au cours de l'expérience semble pouvoir s'expliquer et se comprendre dans la mesure où les forces génératrices élémentaires ne sont pas identiques au niveau des sarcomères, ces derniers en série présentant en effet de grandes variations de longueur. Quoiqu'il en soit la mesure maximale de la tension peut être obtenue puisque la diminution légère de la tension révélant le début de la rupture intervient après le plateau de tension et donc au bout d'un temps relativement long. Au niveau de la fibre intacte, du fait même de la présence des structures membranaires et de la relative brièveté de la contraction phasique, ce phénomène de rupture de la fibre ne se produit que très rarement.

### III - CONTRACTURE

Sur la fibre intacte un premier problème s'est posé, à savoir la reproductibilité du phénomène de contracture produit par un excès de  $K^+$ . En effet, il est extrêmement difficile, ou alors après un laps de temps très long (voire l'heure), d'obtenir consécutivement sur la même fibre deux contractures potassiques. Quoiqu'il en soit, une analyse statistique des amplitudes maximales de contracture a permis de pallier à cet inconvénient.

Les ions  $K^+$  en excès provoquent la dépolarisation membranaire qui favorise ainsi l'entrée de  $Ca^{++}$  à l'intérieur de la fibre musculaire. Au niveau des fibres musculaires de crustacés, la nature du courant entrant a été montrée être calcique (FATT et GINSBORG, 1958 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a ; KEYNES et coll., 1973 ; MOUNIER et VASSORT, 1975 a). En ce qui concerne en particulier la fibre musculaire de crabe, il a été possible

de montrer que ce courant entrant, influencé par la dépolarisation membranaire, présente deux composantes : l'une de nature purement calcique représentant l'influx initial rapide, l'autre de nature semble-t-il composite en partie calcique, de cinétique plus lente, correspondant à l'influx lent de  $\text{Ca}^{++}$ . Ces courants entrants permettent un accroissement direct de la concentration intracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  et un accroissement indirect par la stimulation de la libération du  $\text{Ca}^{++}$  des citernes terminales du R.S. Ces courants de  $\text{Ca}^{++}$ , éliminés par la suppression du  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire, peuvent cependant être portés par les ions  $\text{Sr}^{++}$ . Il a en effet été possible d'observer que le remplacement mM à mM de tous les ions  $\text{Ca}^{++}$  externes par des ions  $\text{Sr}^{++}$  permet le développement de la contracture potassique qui présente cependant un décours différent, plus lent, bien que le courant entrant porté dans ce cas par les ions  $\text{Sr}^{++}$  soit plus ample (MOUNIER et VASSORT, 1975 a). Ce courant porté par les ions  $\text{Sr}^{++}$  serait là encore décomposé en deux influx, l'un rapide et l'autre lent. De même que la dépolarisation membranaire est responsable de ces activations, il s'avère que la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  ou en  $\text{Sr}^{++}$  exerce elle aussi une influence positive sur ces influx de  $\text{Ca}^{++}$  ou de  $\text{Sr}^{++}$ . La décomposition en deux influx, rapide initial puis lent, a pu être discernée, entre autre, grâce à la présence des ions  $\text{Mn}^{++}$  et par leur seuil de potentiel d'activation différent. En absence de rectification retardée (présence de TEA : 58 mM), l'addition d'ions  $\text{Mn}^{++}$  aux solutions de prétraitement des fibres supprime l'aspect biphasique de la contracture ainsi que de l'évolution du potentiel de membrane. Les ions  $\text{Mn}^{++}$  sont sans effet sur la composante lente du courant entrant et sur le développement lent de la contracture. Par contre, ainsi que cela a été précisé, la concentration extracellulaire en  $\text{Ca}^{++}$  influence de manière positive l'influx de  $\text{Ca}^{++}$ . La suppression du  $\text{Ca}^{++}$  extracellulaire pendant un laps de temps très court (20 secondes) suffit à réduire considérablement l'amplitude de la contracture et même à l'annuler complètement. Cette absence de contracture est corrélée avec l'absence de point d'inflexion dans le déroulement de la dépolarisation membranaire. Dans le cas où la contracture subsiste bien que considérablement réduite, l'aspect biphasique de la dépolarisation membranaire persiste avec cependant des maxima beaucoup moins amples que dans les conditions de référence. Ces résultats semblent impliquer qu'une entrée de  $\text{Ca}^{++}$  soit requise pour permettre la libération de  $\text{Ca}^{++}$  par le R.S. D'autre part, la présence de jonctions de couplage, très différenciées,

d'aspect palissadique, entre l'abondant système tubulaire et le R.S. (la microscopie électronique semble révéler la présence de trabécules :

DELORME et coll., 1978 ), permet d'émettre l'hypothèse d'une possibilité de couplage électrique par l'intermédiaire des ions  $Ca^{++}$  entre ces deux systèmes membranaires comme l'a suggéré dès 1965 BIRKS chez la fibre squelettique de grenouille. Le schéma électrique d'un tel couplage pourrait être représenté par un transistor. Cette hypothèse demande bien évidemment à être vérifiée, c'est la raison pour laquelle des expériences concernant la diffusion des molécules de microperoxydase (diamètre inférieur à 20 Å) dans les différents systèmes membranaires sont envisagées. Malheureusement, le grand délai d'obtention de cette substance ne nous a pas encore permis de réaliser cette expérience.

L'importance de l'influx de  $Ca^{++}$  dépend également des concentrations en ions  $Na^+$  et  $Mg^{++}$ . La présence de  $Na^+$  intervient en effet sur l'influx de  $Ca^{++}$ . De fait, l'absence de  $Na^+$  extracellulaire permet le développement d'un potentiel d'action qui présente un overshoot durable (FATT et KATZ, 1953 ; HAUDECOEUR, 1971 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1972 a). Cet accroissement du PA n'est pas dû à une inhibition de la rectification retardée par les ions choline<sup>+</sup> remplaçant les ions  $Na^+$  puisque HAUDECOEUR (1975) observe en présence de TEA un accroissement d'amplitude du PA quand également les ions  $Na^+$  sont remplacés par les ions choline<sup>+</sup>. L'absence de  $Na^+$  extracellulaire conduit également à une diminution du  $Na^+$  intracellulaire (VAUGHAN JONES, 1976) qui peut entraîner une diminution de la libération de  $Ca^{++}$  par le R.S. et augmenter ainsi le PA grâce au maintien de la "driving force" pour les ions  $Ca^{++}$  à une valeur plus élevée. D'autre part, un effet de "frein" sur l'influx de  $Ca^{++}$  peut être obtenu par la présence de  $Mg^{++}$  dans le milieu environnant. Cet effet régulateur de l'entrée de  $Ca^{++}$ , obtenue par le  $Mg^{++}$ , signalé par GUILBAULT et coll. (1965 ; 1966)

et GUILBAULT (1966) sur la fibre cardiaque a pu être mis en évidence au niveau de la fibre musculaire de crabe.

Le remplacement des ions  $Na^+$  externes par des ions  $Li^+$  aboutit à une réduction de la concentration intracellulaire en  $Na^+$  (VAUGHAN JONES, 1976) et donc à son remplacement intracellulaire par le  $Li^+$  ce qui a pour conséquence de supprimer ou pour le moins de réduire la libération du  $Ca^{++}$

par le R.S. (VASSORT, 1972 ; HORACKOVA et VASSORT, 1974). Ainsi, peut être révélée l'existence, au niveau de la contracture potassique, d'une troisième composante, dépendante du  $\text{Ca}^{++}$  réticulaire libéré, qui se développe en fait très tôt, à savoir dès la première composante consécutive à l'influx rapide de  $\text{Ca}^{++}$ . Cette libération de  $\text{Ca}^{++}$  des citernes du R.S. augmente, parallèlement à l'influx de  $\text{Ca}^{++}$ , la concentration interne en cet ion et permet de ce fait l'accroissement de la contraction.

L'activation myofibrillaire dans le cas de cette étude est sous la dépendance de la dépolarisation membranaire due à l'enrichissement extracellulaire en ions  $\text{K}^+$ . Cette dépolarisation membranaire provoque, ainsi que cela vient d'être décrit, l'influx de  $\text{Ca}^{++}$  mais intervient également au niveau du phénomène de rectification normale (BRULE et coll., 1976), rectification normale qui freine donc en retour la dépolarisation. Une partie de l'étude présentée dans ce mémoire et notamment la comparaison des effets du TEA sur la fibre musculaire de grenouille et sur celle de crabe a permis de montrer l'importance de la nature même du courant passant par le canal de rectification retardée. De fait, il s'avère que les ions  $\text{Cl}^-$  participent pour une grande part au courant retardé porté pour environ 22 % par les ions  $\text{K}^+$  et 78 % par les ions  $\text{Cl}^-$  (HAUDECOEUR et coll., 1977). La concentration extracellulaire de  $\text{Cl}^-$  influence la dépolarisation consécutive à l'enrichissement du milieu en  $\text{K}^+$  par le biais de l'amplitude du courant retardé sous la dépendance de la "driving force" pour les ions  $\text{Cl}^-$ . De plus, comme le TEA abolit la rectification retardée de nature potassique sur les fibres squelettiques de grenouille, il annulerait donc, à des concentrations similaires, le courant retardé porté pour une très large part par les ions  $\text{Cl}^-$  sur la fibre squelettique de crabe (STANFIELD, 1970 ; KEYNES et coll., 1973 ; HAUDECOEUR et GUILBAULT, 1974 ; BRULE et coll., 1976). Du fait de la suppression de la rectification retardée par la présence de TEA, la vitesse de dépolarisation membranaire ainsi que son amplitude se trouvent augmentées et le développement de la contracture potassique renforcé. La concentration en  $\text{Cl}^-$  extracellulaire intervient donc au niveau des phénomènes membranaires mais ne semble pas par contre jouer sur la concentration intracellulaire de cet ion dans la mesure où il a été montré qu'un appauvrissement de la teneur en  $\text{Cl}^-$  au contact des myofilaments diminue l'amplitude de leur contraction et dans la mesure où en milieu pauvre en  $\text{Cl}^-$  la contracture se trouve renforcée. Ce résultat vient

donc à l'encontre de l'hypothèse d'une distribution passive du  $\text{Cl}^-$  selon son gradient électrochimique. Le chlore semble donc bien jouer un rôle indispensable pour le meilleur "fonctionnement mécanique" de cette fibre et, se trouve être par voie de conséquence, en plus du  $\text{Ca}^{++}$ , un maillon important dans le couplage excitation-contraction.

L'ensemble de ces résultats permet de compléter les schémas précédents à savoir ceux relatifs à l'influence des ions sur l'activité ATPasique et la contraction des myofilaments (Figs 87 et 88) et d'établir finalement un schéma cybernétique d'ensemble (Fig. 89) du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique du crabe, Carcinus maenas.



### Figure 89

Schéma cybernétique du couplage excitation-contraction de la fibre musculaire striée squelettique du crabe *Carcinus maenas*.

La dépolarisation membranaire est induite par le  $\text{K}^+$  externe. Les flèches en trait plein notées par un signe  $\oplus$  représentent des effets positifs aux différents niveaux : membranaire, activité ATPasique et contraction des myofilaments. Les flèches en pointillés notées par un signe  $\ominus$  représentent des effets négatifs. Les flèches en points et pointillés notées par un signe  $\odot$  marquent l'absence d'effets de l'ion au niveau considéré (par exemple, l'ion  $\text{Mn}^{++}$  sur l'influx lent  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ).

Au niveau du milieu intérieur, deux flèches partant de  $\text{Ca}^{++}_i$  et de  $\text{Mg}^{++}_i$  et, aboutissant au niveau de l'activité ATPasique, sont en fait notées par deux signes  $\oplus$  et  $\ominus$ , montrant ainsi l'existence d'un optimum de concentration pour les ions considérés.

Enfin, le point  $\odot$  signale l'existence présumée d'un maillon pour lequel la présence de  $\text{Cl}^-$  est indispensable afin d'obtenir un bon rapport entre l'activité ATPasique et la contraction des myofilaments.

Le terme "membrane" implique non seulement la membrane sarcolemmique mais également les membranes tubulaires.





RESUME



Le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire striée de crabe a été abordé de différentes manières sur cette préparation qui présente une ultrastructure complexe avec notamment d'abondantes zones de couplage.

L'étude de l'activité ATPasique des protéines de structure permet de connaître l'importance de l'environnement ionique et de mettre en évidence l'existence d'optima de concentration pour les ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ . De plus, un point attire l'attention en ce qui concerne l'environnement anionique, à savoir que la substitution totale des ions  $\text{Cl}^-$  par des ions nitrate, méthylsulfate ou sulfate accroît considérablement l'activité ATPasique et que les ions  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$  sont activateurs.

L'étude de la contraction des myofilaments isolés, préparation dépourvue de tout système membranaire fonctionnel (membranes tubulaires et réticulaires, diades) permet de mettre en évidence une relation linéaire liant l'activité ATPasique à la contraction dès l'instant où les ions  $\text{Cl}^-$  sont présents dans le milieu environnant. Si l'absence d'ions  $\text{Cl}^-$ , ceux-ci étant remplacés par des ions nitrate, méthylsulfate ou sulfate, renforce l'activité ATPasique, elle inhibe par contre les contractions même des myofilaments, semblant montrer l'existence d'un maillon au niveau duquel les ions  $\text{Cl}^-$  seraient indispensables pour un meilleur couplage mécanochimique.

Enfin, l'étude de la contracture potassique et l'enregistrement simultané de l'évolution du potentiel de membrane fait connaître la part de l'intervention des ions au niveau membranaire, connaissant leurs actions au niveau des myofilaments (contraction et activité ATPasique). Comme dans les études précédentes un point important est consacré à l'ion  $\text{Cl}^-$  qui se trouve être responsable pour une très grande part du courant passant par le canal de rectification retardée, inhibé par les ions TEA. En effet, l'étude comparative de l'action du TEA sur la fibre musculaire de grenouille et sur celle de crabe, montrant des effets inverses, ainsi que l'action du TEA en milieu de concentrations variées en  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  sur la fibre de crabe ont contribué à montrer, chez cette dernière, l'importance de la rectifi-

cation retardée liée à un mouvement d'ions  $\text{Cl}^-$ .

La contracture obtenue par la dépolarisation due à l'excès de  $\text{K}^+$  présente en fait trois composantes, la première dépend d'un influx rapide de  $\text{Ca}^{++}$ , la seconde d'un courant entrant lent porté en partie par les ions  $\text{Ca}^{++}$ . Quant à la troisième composante de la contracture elle est en relation avec la libération du  $\text{Ca}^{++}$  du reticulum sarcoplasmique et débute en fait très tôt, à savoir dès la première phase correspondante à l'influx rapide de  $\text{Ca}^{++}$ . Cette troisième composante est en partie inhibée lors du remplacement du  $\text{Na}^+$  intracellulaire par du  $\text{Li}^+$  en absence de  $\text{Na}^+$  extracellulaire (remplacement mM à mM du  $\text{Na}^+$  par  $\text{Li}^+$ ). De plus, les influx de  $\text{Ca}^{++}$  sont indispensables à l'obtention de cette contracture puisqu'en effet, 20 secondes seulement après la suppression de ces ions dans le milieu externe, la contracture est abolie.



BIBLIOGRAPHIE

- ADRIAN, R.H., CHANDLER, W.K., HODGKIN, A.L. (1970)  
Voltage clamp experiments in striated muscle fibres,  
J. Physiol., London, 208, 607-644.
- ALLEN, R.D., HINKE, J.A.M. (1971)  
Na<sup>+</sup>-Li<sup>+</sup> exchange in single muscle fibers of the giant barnacle.  
Can. J. Physiol. Pharmacol., 49, 862-866.
- APRIL, E.W., BRANDT, P.W. (1973)  
The myofilament lattice : studies on isolated fibers. III - The effect  
of myofilament spacing upon tension.  
J. Gen. Physiol., 61, 490-508.
- APRIL, E.W., BRANDT, P.W., ELLIOTT, G.F. (1972)  
The myofilament lattice : studies on isolated fibers. II - The effects  
of osmotic strength, ionic concentration and pH upon the unit-cell  
volume.  
J. Cell. Biol., 53, 53-65.
- ASHLEY, C.C. (1967)  
The role of cell calcium in the contraction of single cannulated muscle  
fibers.  
Am. Zoologist, 7, 647-659.
- ASHLEY, C.C., ELLORY, J.C., HAINAUT, K. (1974)  
Calcium movements in single crustacean muscle fibres.  
J. Physiol., London, 242, 255-272.
- ATWOOD, H.L. (1963)  
Differences in muscle fiber properties as a factor in "fast" and "slow"  
contraction in Carcinus.  
Comp. Biochem. Physiol., 10, 17-32.
- ATWOOD, H.L. (1968)  
Influence of nitrate and other anions on fast and slow contractions of  
crab muscle.  
Can. J. Physiol. Pharmacol., 46, 1-9.
- ATWOOD, H.L. (1971)  
Z and T tubules in stomach muscles of the spiny lobster.  
J. Cell. Biol., 50, 264-268.
- ATWOOD, H.L., DORAI RAJ, B.S. (1964)  
Tension development and membrane responses in phasic and tonic muscle  
fibers of a crab.  
J. Cell. Comp. Physiol., 64, 55-72.
- ATWOOD, H.L., HOYLE, G., SMYTH, T. (1965)  
Mechanical and electrical responses of single innervated crab-muscle  
fibres.  
J. Physiol., London, 180, 449-482.
- AVENA, R.M., BOWEN, W.J. (1971)  
Adenosine triphosphate inhibition in myosin adenosine triphosphate systems.  
J. Biol. Chem., 246, 2265-2270.

- AZUMA, N., ASAKURA, A., YAGI, K. (1975)  
Myosin from Molluscan Abalone, *Haliotis discus*. Isolation and enzymatic properties.  
*J. Biochem.*, 77, 973-981.
- BAILEY, K. (1942)  
Myosin and adenosinetriphosphatase.  
*Biochem. J.*, 36, 121-139.
- BAILEY, K. (1948)  
Tropomyosin : a new asymmetric protein component of the muscle fibril.  
*J. Biochem.*, 43, 271-278.
- BÁRÁNY, M. (1967)  
ATPase activity of myosin correlated with speed of muscle shortening.  
*J. Gen. Physiol.*, 50, 197-218.
- BÁRÁNY, M., BÁRÁNY, K. (1970)  
Change in the reactivity of myosin during muscle contraction.  
*J. Biol. Chem.*, 245, 2717-2721.
- BÁRÁNY, M., BÁRÁNY, K., RECKARD, T., VOLPE, A. (1965)  
Myosin of fast and slow muscle of the rabbit.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 109, 185-191.
- BASS, B.G., CIULLA, E.M., KLOP, P., VAN BAAL, S. (1975)  
Some electrical and mechanical effects of strontium on toad ventricular muscle : comparison to calcium.  
*J. Physiol., London*, 252, 547-564.
- BEATY, G.N., STEFANI, E. (1976 a)  
Calcium dependent electrical activity in twitch muscle fibres of the frog.  
*Proc. R. Soc. Lond. B.*, 194, 141-150.
- BEATY, G.N., STEFANI, E. (1976 b)  
Inward calcium current in twitch muscle fibres of the frog.  
*J. Physiol., London*, 260, 27 P.
- BENDALL, J.R. (1953)  
Further observations on a factor (the "Marsh" factor) effecting relaxation of ATP-shortened muscle-fibre models, and the effect of Ca and Mg ions upon it.  
*J. Physiol., London*, 121, 232-254.
- BENNINGER, C., EINWÄCHTER, H.M., HAAS, H.G., KERN, R. (1976)  
Calcium-sodium antagonism on the frog's heart : a voltage-clamp study.  
*J. Physiol., London*, 259, 617-645.
- BENOIT, P.H. (1975)  
Communication orale.  
Réunion des Physiologistes, Louvain, 22 Novembre 1975.



- BERNARD, C., GARGOUÏL, Y.M., ROUGIER, O., RAYMOND, G., GARNIER, D. (1968)  
La réponse et les courants transmembranaires de la fibre auriculaire cardiaque d'Axolotl ; existence d'un canal rapide insensible à la tetrodotoxine, présence d'un canal lent.  
J. Physiol., Paris, 60, 346.
- BERNARD, C., SASSINE, A., GARGOUÏL, Y.M. (1974)  
Actions of Ca<sup>++</sup>, Sr<sup>++</sup> and Ba<sup>++</sup> ions on the electrical properties of cardiac membrane.  
Bioelectrochem. Bioenerg., 1, 200-207.
- BESSEAU, A., GARGOUÏL, Y.M. (1969)  
Ionic currents in rat ventricular heart fibers : voltage-clamp experiments using double sucrose-gap technique.  
J. Physiol., London, 204, 95 P.
- BESSEAU, A., LEOTY, C., GARGOUÏL, Y.M. (1969)  
Etude en courant ou voltage imposé, de préparations ventriculaires cardiaques de rat par la technique de double separation de saccharose.  
C. R. Acad. Sci. Paris, 268, 2714-2717.
- BEZANILLA, F., CAPUTO, C., GONZALEZ-SERRATOS, H., VENOSA, R.A. (1972)  
Sodium dependence of the inward spread of activation in isolated twitch muscle fibres of the frog.  
J. Physiol., London, 223, 507-523.
- BIANCHI, C.P. (1961)  
Calcium movements in muscle.  
Circulation, 24, 518-522.
- BIANCHI, C.P. (1968)  
Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle.  
Fed. Proc., 27, 126-131.
- BIANCHI, C.P., SHANES, A.M. (1959)  
Calcium influx in skeletal muscle at rest, during activity, and during potassium contracture.  
J. Gen. Physiol., 42, 803-815.
- BIRKS, R.I. (1965)  
The sarcoplasmic reticulum of twitch fibres in the frog sartorius muscle.  
In : "Muscle", PERGAMON PRESS Ed., Oxford, London, 199-216.
- BLINKS, J.R. (1965)  
Influence of osmotic strength on cross-section and volume of isolated single muscle fibres.  
J. Physiol., London, 177, 42-57.
- BOCHARNIKOVA, I.M., MALAKHOV, A.A., SAMORUKOVA, O.D. (1974)  
Effect of Ca ions on stationary kinetics of ATPase reaction of myosin.  
Biofizika SSSR, 39, 413-417.
- BOLZER, E. (1961)  
Distribution of nonelectrolytes in muscle.  
Amer. J. Physiol., 200, 651-655.

- BOREJDO, J., OPLATKA, A. (1976)  
Tension development in skinned glycerinated rabbit psoas fiber segments irrigated with soluble myosin fragments.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 440, 241-258.
- BOWEN, W.J., MANDELKERN, L. (1970)  
The relationship between shortening of glycerinated muscle fibers and ATPase activity.  
*Physiol. Chem. Physics*, 2, 227-241.
- BOWEN, W.J., MANDELKERN, L. (1971)  
Glycerinated muscle fibers : relation between isometric tension and adenosine triphosphate hydrolysis.  
*Science*, 173, 239-240.
- BOWEN, W.J., MARTIN, H.L. (1963)  
A study of diffusion of ATP through glycerol-treated muscle.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 102, 286-292.
- BRANDT, P.W., REUBEN, J.P., GRUNDFEST, H. (1972)  
Regulation of tension in the skinned crayfish muscle fiber. II - Role of calcium.  
*J. Gen. Physiol.*, 59, 305-317.
- BREMEL, R.D., WEBER, A. (1972)  
Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle.  
*Nature New Biology*, 238, 97-101.
- BRÛLÉ, G. (1972)  
Etude de la secousse de la fibre musculaire striée de crabe.  
Thèse 3e Cycle, Univ. LILLE I,
- BRÛLÉ, G., FALEMPIN, M., GUILBAULT, P. (1970)  
Effets de milieux riches en potassium ( $K^+$ ) et privés de sodium ( $Na^+$ ) sur les propriétés mécaniques de la fibre musculaire isolée de crabe.  
*J. Physiol., Paris*, 62, 136-137.
- BRÛLÉ, G., FALEMPIN, M., GUILBAULT, P. (1972)  
Les ions potassium ( $K^+$ ), calcium ( $Ca^{++}$ ) et sodium ( $Na^+$ ) dans le développement de la contracture potassique de la fibre striée phasique de crabe.  
*C. R. Acad. Sci. Paris*, 275, 1649-1652.
- BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P. (1975)  
Effets des cations sur la contraction des myofilaments de la fibre striée de crabe.  
*C. R. Acad. Sci. Paris*, 280, 1269-1272.
- BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1976)  
Delayed rectification in the skeletal muscle fibre of the crab.  
*J. Physiol., London*, 263, 251-252 P.
- BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1977 a)  
Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe. I - Aspects électrique et mécanique.  
*J. Physiol., Paris*, 73, 663-674.

- BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1977 b)  
Existence of two components of dynamic inward current in the crab skeletal muscle fibre.  
Proc. Int. Union Physiol. Sci., 13, 101.
- BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1978)  
Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe. Influence des ions  $\text{Li}^+$ , en absence de rectification retardée inhibée par le TEA, sur le PA et sur la contracture.  
A soumettre au J. Physiol., Paris.
- BUKATINA, A.Ye. (1971 a)  
Dependence of tension and ATPase activity of glycerinized muscle fibres on the relative length of the fibre.  
Biofizika SSSR, 16, 1, 52-59.
- BUKATINA, A.Ye. (1971 b)  
Possible causes of self-relaxation of glycerinized muscle fibres.  
Biofizika SSSR, 16, 5, 857-864.
- BUSSELEN, P., VAN KERKHOVE, E. (1975)  
The effects of low external sodium on contracture tension and Ca movements in the goldfish ventricle.  
Arch. Internat. Physiol. Bioch., 83, 337-340.
- CAILLÉ, J., ILDEFONSE, M., ROUGIER, O. (1977 a)  
Time and voltage dependent sodium conductance in tubular membrane of frog twitch fibres : a possible step in excitation-contraction coupling.  
Proc. Int. Union Physiol. Sci., 13, 319.
- CAILLÉ, J., ILDEFONSE, M., ROUGIER, O. (1977 b)  
Rôle des ions sodium dans le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique.  
J. Physiol., Paris, réunion de l'Association des Physiologistes à Grenoble du 10 au 13 Novembre 1977 (sous presse).
- CALDWELL, P.C., WALSTER, G. (1963)  
Studies on the micro-injection of various substances into crab muscle fibres.  
J. Physiol., London, 169, 353-372.
- CAPUTO, C., GIMENEZ, M. (1967)  
Effects of external calcium deprivation on single muscle fibers.  
J. Gen. Physiol., 50, 2177-2195.
- CARVALHO, A.P. (1968)  
Effects of potentiators of muscular contraction on binding of cations by sarcoplasmic reticulum.  
J. Gen. Physiol., 51, 427-442.
- CHA, Y.N., SHIN, B.C., LEE, K.S. (1971)  
Active uptake of  $\text{Ca}^{++}$  and  $\text{Ca}^{++}$  activated  $\text{Mg}^{++}$  ATPase in red cell membrane fragments.  
J. Gen. Physiol., 57, 202-215.



- CHAPMAN, R.A. (1974)  
A study of the contractures induced in frog atrial trabeculae by a reduction of the bathing sodium concentration.  
J. Physiol., London, 237, 295-313.
- CHAPMAN, R.A., ELLIS, D. (1977 a)  
The effects of manganese ions on the contraction of the frog's heart.  
J. Physiol., London, 272, 331-354.
- CHAPMAN, R.A., ELLIS, D. (1977 b)  
Uptake and loss of manganese from perfused frog ventricles.  
J. Physiol., London, 272, 355-366.
- CHAPMAN, R.A., OCHI, R. (1972)  
The effects of manganese ions on the contractile responses of isolated frog atrial trabeculae.  
J. Physiol., London, 222, 56-58 P.
- CHAPMAN, R.A., TUNSTALL, J. (1969)  
Evidence for the site of Na/Ca antagonism in cardiac muscle of the frog, *Rana pipiens*.  
J. Physiol., London, 201, 9-11 P.
- CHAPMAN, R.A., TUNSTALL, J. (1970)  
The relationship between the external calcium concentration and the contracture tension developed by auricular trabeculae isolated from the heart of the frog, *Rana pipiens*.  
J. Physiol., London, 210, 147-148 P.
- CHAPMAN, R.A., TUNSTALL, J. (1971)  
The dependence of the contractile force generated by frog auricular trabeculae upon the external calcium concentration.  
J. Physiol., London, 215, 139-162.
- CHARNOCK, J.S., ALMEIDA, A.F., TO, R. (1975)  
Temperature-activity relationships of cation activation and ouabain inhibition of  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ .  
Arch. Biochim. Biophys., 167, 480-487.
- CHIARANDINI, D.J., STEFANI, E. (1973)  
Effects of manganese on the electrical and mechanical properties of frog skeletal muscle fibres.  
J. Physiol., London, 232, 129-147.
- CHOCK, S.P., CHOCK, P.B., EISENBERG, E. (1976)  
Pre-steady-state kinetic evidence for a cyclic interaction of myosin subfragment one with actin during the hydrolysis of adenosine 5'-triphosphate.  
Biochemistry, 15, 3244-3253.
- COHEN, C., CASPAR, D.L.D., PARRY, D.A.D., LUCAS, R.M. (1971)  
Tropomyosin crystal dynamics.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 36, 205-216.
- COSTANTIN, L.L. (1971)  
Biphasic potassium contractures in frog muscle fibers.  
J. Gen. Physiol., 58, 117-130.

- COSTANTIN, L.L. (1975)  
Contractile activation in skeletal muscle,  
Prog. Biophys. Mol. Biology, 29, 199-224.
- COSTANTIN, L.L., PODOLSKY, R.J. (1967)  
Depolarization of the internal membrane system in the activation of frog skeletal muscle,  
J. Gen. Physiol., 50, 1101-1124.
- CSAPO, A. (1959)  
Studies on excitation-contraction coupling.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 81, 453-467.
- CURTIS, B.A. (1966)  
Ca fluxes in single twitch muscle fibers.  
J. Gen. Physiol., 50, 255-267.
- DABROWSKA, R., SZPACENKO, A. (1977)  
Comparison of the composition and properties of natural actomyosin from carp (*Cyprinus carpio*) and rabbit skeletal muscle.  
Comp. Biochem. Physiol., 56 B, 139-142.
- DALY, I. de B., CLARK, A.J. (1921)  
The action of ions upon the frog's heart.  
J. Physiol., London, 54, 367-383.
- DANCKER, P. (1970)  
Natural tropomyosin as a physiological inhibitor of the contractile activity of actomyosin.  
Pflügers Arch., 315, 187-197.
- DAVYDOV, A.S. (1974)  
Molecular mechanism of contraction of striated muscles.  
Studia biophysica, Berlin, 47, 221-228.
- DEITMER, J.W. (1977)  
Effects of cobalt and manganese on the calcium-action potentials in larval insect muscle fibres (*Ephesia kühniella*).  
Comp. Biochem. Physiol., 58 A, 1-4.
- DELORME, P., BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P., HAUDECOEUR, G. (1978)  
Effets de solutions hypertoniques sur le couplage excitation-contraction de la fibre musculaire squelettique de crabe. II - Aspects ultrastructuraux.  
J. Physiol., Paris, soumis pour publication.
- DESHCHEREVSKY, V.I. (1977)  
Kinetic model of regulation of muscle protein activity.  
J. Theor. Biol., 64, 517-534.
- DE VILLAFRANCA, G.W. (1961)  
The A and I band lengths in stretched or contracted horseshoe crab skeletal muscle.  
J. Ultrastruct. Res., 5, 109-115.

- DE VILLAFRANCA, G.W. (1967)  
The adenosinetriphosphatase activity of myofibrils from the horseshoe crab, *Limulus polyphemus*.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 21, 259-271.
- DE VILLAFRANCA, G.W., CAMPBELL, L.K. (1969)  
Magnesium activation of natural actomyosin ATPase from horseshoe crab.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 29, 775-783.
- DE VILLAFRANCA, G.W., FRIEDMAN, B.A. (1975)  
Magnesium control of the calcium myosin and actomyosin ATPase of *Limulus polyphemus*.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 51 B, 375-383.
- DIPOLO, R. (1973)  
Sodium-dependent calcium influx in dialyzed barnacle muscle fibers.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 298, 279-283.
- DORAI RAJ, B.S. (1964)  
Diversity of crab muscle fibers innervated by a single motor axon.  
*J. Cell. Comp. Physiol.*, 64, 41-54.
- DRABIKOWSKI, W., NOWAK, E., BARYLKO, B., DABROWSKA, R. (1972)  
Tropinin-its composition and interaction with tropomyosin and F. actin.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 245-249.
- DREIZEN, P. (1971)  
Structure and function of myofibrillar contractile proteins.  
*Ann. Rev. Med.*, 22, 365-390.
- DULLEY, J.R. (1975)  
Determination of inorganic phosphate in the presence of detergents or protein.  
*Anal. Biochem.*, 67, 91-96.
- DUNHAM, E.T., GLYNN, I.M. (1961)  
Adenosine triphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions.  
*J. Physiol., London*, 156, 274-293.
- DUVAL, A., LEOTY, C. (1977)  
Voltage-clamp studies in rat fast skeletal muscle.  
*J. Physiol., London*, 270, 45-46 P.
- EBASHI, S. (1968)  
Contractile proteins of cardiac muscle.  
*Jap. Circulat. J.*, 32, 1797-1800.
- EBASHI, S. (1976)  
Excitation-contraction coupling.  
*Ann. Rev. Physiol.*, 38, 293-313.
- EBASHI, S., ENDO, M. (1968)  
Calcium ion and muscle contraction.  
*Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 18, 123-183.

- EBASHI, S., KODAMA, A., EBASHI, F. (1968)  
Troponin. I - Preparation and physiological function.  
J. Biochem., Tokyo, 64, 465-477.
- EBASHI, S., OHTSUKI, I., MIHASHI, K. (1972)  
Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 215-223.
- EDMAN, K. (1957)  
On the contraction of glycerol-extracted muscle fibre bundles under highly isometric conditions.  
Acta physiol. Scand., 41, 229-254.
- EDWARDS, C., CHICHIBU, S., HAGIWARA, S. (1964)  
Relation between membrane potential changes and tension in barnacle muscle fibers.  
J. Gen. Physiol., 48, 225-234.
- EISENBERG, B., EISENBERG, R.S. (1968 a)  
Selective disruption of the sarcotubular system in frog sartorius muscle.  
J. Cell Biol., 39, 451-467.
- EISENBERG, B., EISENBERG, R.S. (1968 b)  
Transverse tubular system in glycerol-treated skeletal muscle.  
Nature, 160, 1243-1244.
- EISENBERG, E., KIELLEY, W.W. (1970)  
Native tropomyosin : effect on the interaction of actin with heavy meromyosin and subfragment-1.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 50-56.
- EISENBERG, E., MOOS, C. (1968)  
The ATPase activity of acto-heavy meromyosin.  
Biochemistry, 7, 1486-1489.
- EISENBERG, E., MOOS, C. (1970)  
Actin activation of heavy meromyosin adenosine triphosphatase.  
J. Biol. Chem., 245, 2451-2456.
- EISENBERG, R.S., GAGE, P.W. (1967)  
Frog skeletal muscle fibers : changes in electrical properties after disruption of transverse tubular system.  
Science, 158, 1700-1701.
- ELLIS, D. (1977)  
The intracellular sodium ion concentration of sheep Purkinje fibres and its relationship to external sodium.  
J. Physiol., London, 266, 74-75 P.
- ENDO, M. (1964)  
The superprecipitation of actomyosin and its ATPase activity in low concentrations of ATP.  
J. Biochem., Tokyo, 55, 614-622.

- ENDO, M. (1975)  
Conditions required for calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum.  
Proc. Japan Acad., 51, 467-472.
- ENDO, M. (1977)  
Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.  
Physiol. Rev., 57, 71-108.
- ENDO, M., KITAZAWA, T. (1976)  
The effect of ATP on calcium release mechanisms in the sarcoplasmic reticulum of skinned muscle fibers.  
Proc. Japan Acad., 52, 595-598.
- ENDO, M., TANAKA, M., OGAWA, Y. (1970)  
Calcium induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned skeletal muscle fibres.  
Nature, 228, 34-36.
- ETZENSPERGER, J. (1970)  
Effets d'un changement progressif de la concentration en calcium du milieu physiologique sur le potentiel d'action et la secousse de la fibre musculaire squelettique de grenouille.  
J. Physiol., Paris, 62, 299-313.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1972)  
Excitation-contraction coupling of isolated cardiac fibers with disrupted or closed sarcolemmas : calcium dependent cyclic and tonic contractions.  
Circulat. Res., 31, 293-307.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1973)  
Activation of skinned cardiac cells. Subcellular effects of cardio active drugs.  
Europ. J. Cardiol., 1, 143-155.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1975 a)  
Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells.  
J. Physiol., London, 249, 469-495.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1975 b)  
Effects of magnesium on contractile activation of skinned cardiac cells.  
J. Physiol., London, 249, 497-517.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1976)  
Techniques of skinned cardiac cells and of isolated cardiac fibers with disrupted sarcolemmas with reference to the effects of catecholamines and of caffeine.  
In P.E. ROY and N.S. DHALLA, "Recent advances in studies on cardiac structure and metabolism", volume 9 "The sarcolemma", University Park Press Ed., Baltimore, 71-84.
- FABIATO, A., FABIATO, F. (1977)  
Calcium release from the sarcoplasmic reticulum.  
Circulat. Res., 40, 119-129.

- FAHRENBACH, W.H. (1967)  
The fine structure of fast and slow crustacean muscles.  
*J. Cell Biol.*, 35, 69-79.
- FALEMPIN, M. (1972)  
Etude de la contracture de la fibre musculaire de crabe.  
Thèse 3e Cycle, Univ. LILLE I,
- FATT, P., GINSBORG, B.L. (1958)  
The ionic requirements for the production of action potentials in crustacean muscle fibres.  
*J. Physiol.*, London, 142, 516-543.
- FATT, P., KATZ, B. (1953)  
The electrical properties of crustacean muscle fibres.  
*J. Physiol.*, London, 120, 171-204.
- FENNER, C., MASON, D.T., ZELIS, R., WIKMAN-COFFELT, J. (1973)  
Regulatory properties of myocardial myosin (ATPase activity/ $K^+/Ca^{++}$ ).  
*Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70, 3205-3209.
- FINKEL, R.M., GERGELY, J. (1961)  
Studies on cardiac myofibrillar adenosine-triphosphatase.  
*J. Biol. Chem.*, 236, 1458-1462.
- FISKE, C.H., SUBBAROW, Y. (1925)  
The colorometric determination of phosphorus.  
*J. Biol. Chem.*, 66, 375-400.
- FORD, L.E., PODOLSKY, R.J. (1968)  
Force development and calcium movements in skinned muscle fibers.  
*Fed. Proc.*, 27, 375.
- FORD, L.E., PODOLSKY, R.J. (1972 a)  
Calcium uptake and force development by skinned muscle fibres in EGTA buffered solutions.  
*J. Physiol.*, London, 223, 1-19.
- FORD, L.E., PODOLSKY, R.J. (1972 b)  
Intracellular calcium movements in skinned muscle fibres.  
*J. Physiol.*, London, 223, 21-33.
- FRANK, G.B. (1964)  
Evidence for an essential role for calcium in excitation-contraction coupling in skeletal muscle.  
*Proc. Roy. Soc.*, 160, 504-512.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1966)  
Variations in the length of crab myofilaments.  
*J. Physiol.*, London, 186, 25-26 P.
- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1970)  
Natural variability in the length of thin and thick filaments in single fibres from a crab, *Portunus depurator*,  
*J. Cell. Sci.*, 6, 559-592.

- FRANZINI-ARMSTRONG, C. (1975)  
Membrane particles and transmission at the triad.  
Fed. Proc., 34, 1382-1389.
- FUCHS, F. (1974)  
Striated muscle.  
Ann. Rev. Physiol., 36, 461-502.
- FUCHS, F., BAYUK, M. (1976)  
Cooperative binding of calcium to glycerinated skeletal muscle fibers.  
Biochim. Biophys. Acta, 440, 448-455.
- FUCHS, F., BRIGGS, F.N. (1967)  
The site of calcium binding in the activation of myofibrillar contraction.  
Fed. Proc., 26, 598.
- FUCHS, F., BRIGGS, F.N. (1968)  
The site of calcium binding in relation to the activation of myofibrillar contraction.  
J. Gen. Physiol., 51, 655-676.
- FUJINO, M., YAMAGUCHI, T., FUJINO, S. (1972)  
"Glycerol effect" in various kinds of muscle cell.  
Jap. J. Physiol., 22, 477-489.
- FUJINO, M., YAMAGUCHI, T., SYZUKI, K. (1961)  
"Glycerol effect" and the mechanism linking excitation of the plasma membrane with contraction.  
Nature, 192, 1159-1161.
- GAGE, P.W., EISENBERG, R.S. (1969)  
Action potentials, afterpotentials, and excitation contraction coupling in frog sartorius fibers without transverse tubules.  
J. Gen. Physiol., 53, 298-310.
- GAINER, H. (1968)  
The role of calcium in excitation-contraction coupling of lobster muscle.  
J. Gen. Physiol., 52, 88-110.
- GARNIER, D., NARGEOT, J., POURRIAS, B., ROUGIER, O. (1977)  
Ionic mechanism of positive inotropic effect of tryptamine on atrial fibers : study of the excitation-contraction coupling.  
Proc. Int. Union Physiol. Sci., 13, 747.
- GARNIER, D., ROUGIER, O., GARGOUÏL, Y.M., CORABOEUF, E. (1969)  
Analyse électrophysiologique du plateau des réponses myocardiques, mise en évidence d'un courant lent entrant en absence d'ions bivalents.  
Pflügers Arch., 313, 321-342.
- GERGELY, J. (1977)  
Molecular aspects of muscle contraction and regulation.  
Basic Res. Cardiol., 72, 109-117.
- GERGELY, J., PRAGAY, D., SCHOLZ, A.F., SEIDEL, J.G., SRETER, F.A., THOMPSON, M.M. (1965)  
Comparative studies on white and red muscle.  
In S. EBASHI, F. OOSAWA, T. SEKINE and Y. TONOMURA "Molecular biology of muscular contraction", Amsterdam, Elsevier Ed., 145-159.

- GILLESPIE, J.I., HUTTER, O.F. (1975)  
The actions of 4-aminopyridine on the delayed potassium current in skeletal muscle fibres.  
J. Physiol., London, 252, 70-71 P.
- GILLIS, J.M. (1967)  
Contraction of isolated crab myofibrils by local application of calcium ions.  
J. Physiol., London, 191, 103-104 P.
- GILLIS, J.M. (1969)  
The site of action of calcium in producing contraction in striated muscle.  
J. Physiol., London, 200, 849-864.
- GILLIS, J.M. (1972)  
Le rôle du Calcium dans le contrôle intracellulaire de la contraction musculaire.  
Thèse d'Agrégation de l'Enseignement Supérieur, Univ. Cathol. Louvain, 196 p.
- GILLIS, J.M. (1975)  
Le contrôle intracellulaire de la contraction musculaire.  
La Recherche, 6, 60, 840-849.
- GILLIS, J.M. (1977)  
Le couplage excitation-contraction dans la fibre musculaire squelettique et cardiaque.  
J. Physiol., Paris, 73, 863-876.
- GILLIS, J.M., MARECHAL, G. (1974)  
The incorporation of radioactive phosphate into ATP in glycerinated fibres stretched or released during contraction.  
J. Mechanochem. Cell Motility, 3, 55-68.
- GIRARDIER, L., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GRUNDFEST, H. (1963)  
Evidence for anion permselective membrane in crayfish muscle fibers and its possible role in excitation-contraction coupling.  
J. Gen. Physiol., 47, 189-214.
- GODFRAIND, T., DE POVER, A. (1975)  
Influence du Na et du K sur l'inhibition de la (Na + K)-ATPase du coeur de Cobaye par la digoxine ou le calcium.  
Arch. Int. Physiol. Biochim., 83, 599-601.
- GORDON, A.M., GODT, R.E., DONALDSON, S.K.B., HARRIS, C.E. (1973)  
Tension in skinned frog muscle fibers in solutions of varying ionic strength and neutral salt composition.  
J. Gen. Physiol., 62, 550-574.
- GOUBEL, M.M. (1973)  
Contribution à l'étude de la distribution du chlore par la détermination de son activité intracellulaire chez la fibre musculaire striée de crabe.  
Thèse 3e Cycle, Univ. LILLE I,



- GOUBEL, M.M., GUILBAULT, P. (1972)  
Distribution du chlore au niveau de la fibre striée phasique du crabe  
*Carcinus maenas*.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 275, 1796-1798.
- GREASER, M.L., GERGELY, J. (1971)  
Reconstitution of troponin activity from three protein components.  
J. Biol. Chem., 246, 4226-4233.
- GREASER, M.L., GERGELY, J. (1973)  
Purification and properties of the components of troponin.  
J. Biol. Chem., 248, 2125-2133.
- GREASER, M.L., YAMAGUCHI, M., BREKKE, C., POTTER, J., GERGELY, J. (1972)  
Troponin subunits and their interactions,  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 235-244.
- GRÖSCHEL-STEWART, U. (1971)  
Comparative studies of human smooth and striated muscle myosins.  
Biochim. Biophys. Acta, 229, 322-334.
- GUILBAULT, P. (1966)  
Action des ions sur l'activité électrique et l'activité mécanique du  
coeur de Mammifère.  
Thèse Doctorat d'Etat, Univ. ORSAY,
- GUILBAULT, P., CORABOEUF, E., DELAHAYES, J. (1965)  
Action des ions calcium et magnésium sur l'activité ventriculaire du  
coeur de mammifère isolé.  
C. R. Soc. Biol., 159, 65-69.
- GUILBAULT, P., CORABOEUF, E., PADEL, Y. (1963 a)  
Action d'ions anormaux sur la contraction myocardique ventriculaire de  
la Roussette.  
J. Physiol., Paris, 55, 2, 149-150.
- GUILBAULT, P., CORABOEUF, E., PADEL, Y. (1963 b)  
Effets d'ions anormaux sur le mécanogramme ventriculaire du coeur isolé  
de Roussette.  
C. R. Soc. Biol., 157, 1378-1383.
- GUILBAULT, P., DELAHAYES, J., PAILLARD, M. (1966)  
Résistance membranaire de la fibre ventriculaire de Cobaye, Influence  
des ions calcium et magnésium,  
C. R. Soc. Biol., 160, 2031-2035.
- GUTH, L., SAMAHA, F.J. (1969)  
Qualitative differences between Actomyosin ATPase of slow and fast mam-  
malian muscle.  
Experimental Neurology, 25, 138-152.
- HAGIWARA, S., FUKUDA, J., EATON, D.C. (1974)  
Membrane currents carried by Ca, Sr and Ba in barnacle muscle fiber  
during voltage clamp.  
J. Gen. Physiol., 63, 564-578.

- HAGIWARA, S., HENKART, M.P., KIDOKORO, Y. (1971)  
Excitation-contraction coupling in amphioxus muscle cells,  
*J. Physiol., London*, 219, 233-251.
- HAGIWARA, S., KIDOKORO, Y. (1971)  
Na and Ca components of action potential in amphioxus muscle cells,  
*J. Physiol., London*, 219, 217-232.
- HAGIWARA, S., NAKA, K.I. (1964)  
The initiation of spike potential in barnacle muscle fibers under low  
intracellular  $Ca^{++}$ ,  
*J. Gen. Physiol.*, 48, 141-162.
- HAIJDU, S. (1953)  
Mechanism of the staircase and contracture in ventricular muscle.  
*Amer. J. Physiol.*, 174, 371-380.
- HANSON, J., HUXLEY, H.E. (1957)  
Quantitative studies on the structure of cross striated myofibrils.  
II - Investigations by biochemical techniques.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 23, 250-260.
- HARRINGTON, W.F. (1972)  
Muscle proteins and muscle contraction.  
In C.B. ANFINSEN, R.F. GOLDBERGER, A.N. SCHECHTER "Current topics in  
biochemistry", Academic Press Ed., New-York, 135-185.
- HARTSHORNE, D.J., DREIZEN, P. (1972)  
Studies on the subunit composition of troponin.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 225-234.
- HARTSHORNE, D.J., MUELLER, H. (1968)  
Fractionation of troponin into two distinct proteins.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 31, 647-653.
- HARTSHORNE, D.J., PYUN, H.Y. (1971)  
Calcium binding by the troponin complex and the purification and proper-  
ties of troponin A,  
*Biochim. Biophys. Acta*, 229, 698-711.
- HASELGROVE, J.C. (1972)  
X-ray evidence for a conformational change in the actin containing fila-  
ments of vertebrate striated muscle.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 341-352.
- HASSELBACH, W. (1952 a)  
Die Umwandlung von Aktomyosin-ATPase in die L-myosin-ATPase durch  
Aktivatoren und die resultierenden Aktivierungseffekte.  
*Z. Naturforsch.*, 7 B, 163-174.
- HASSELBACH, W. (1952 b)  
Die Diffusionskonstante des Adenosintriphosphats im Inneren der Muskel-  
faser,  
*Z. Naturforsch.*, 7 B, 334-337.

HASSELBACH, W. (1953)

Elektromikroskopische Untersuchungen an Muskel fibrillen bei totaler und partieller Extraktion des L-Myosins.  
Z. Naturforsch., 8 B, 449-451.

HASSELBACH, W. (1964)

Relaxation and the sarcotubular calcium pump.  
Fed. Proc., 23, 909-912.

HASSELBACH, W. (1966)

Structural and enzymatic properties of the calcium transporting membranes of the sarcoplasmic reticulum.  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 137, 1041-1048.

HATZE, H. (1973)

A theory of contraction and a mathematical model of striated muscle.  
J. Theor. Biol., 40, 219-246.

HAUDECOEUR, G. (1971)

Etude des perméabilités ioniques membranaires de la fibre musculaire striée de crabe.  
Thèse 3e Cycle, Univ. LILLE I,

HAUDECOEUR, G. (1975)

Réponse dépolarisante de la fibre musculaire striée squelettique phasique du crabe *Carcinus maenas*. Nature ionique, localisation des conductances ioniques membranaires responsables en rapport avec l'ultrastructure.  
Thèse Doctorat d'Etat, Univ. LILLE I,

HAUDECOEUR, G. (1978)

Communication personnelle.

HAUDECOEUR, G., BRÛLÉ, G., BERTRAND, F. (1977)

Le courant dynamique sortant de la fibre squelettique de crabe. Est-il porté par les ions  $K^+$  et/ou les ions  $Cl^-$  ?  
J. Physiol., Paris, Congrès des Physiologistes, Réunion de Grenoble, Novembre 1977.

HAUDECOEUR, G., BRÛLÉ, G., GUILBAULT, P. (1972)

Influence du calcium ( $Ca^{++}$ ) et du magnésium ( $Mg^{++}$ ) extracellulaires sur les activités électrique et mécanique de la fibre striée squelettique d'Invertébré.  
J. Physiol., Paris, 65, 244-245 A.

HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1972 a)

Contribution à l'étude de l'activité électrique de la fibre musculaire striée de crabe (*Carcinus maenas*). I - Effets sur le potentiel d'action de solutions de contenu ionique modifié.  
J. Physiol., Paris, 64, 367-386.

HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1972 b)

Existence d'un antagonisme  $Ca^{++}$ - $Mg^{++}$  au niveau de l'activité électrique de la fibre musculaire striée de crabe.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 274, 2889-2892.

- HAUDECOEUR, G., GUILBAULT, P. (1974)  
Etude des phénomènes de rectification membranaire de la fibre musculaire striée de crabe (*Carcinus maenas*),  
C. R. Acad. Sci., Paris, 278, 2457-2460.
- HEILBRUNN, L.V., WIERCINSKI, F.J. (1947)  
The action of various cations on muscle protoplasm,  
J. Cell. Comp. Physiol., 29, 15-32.
- HENČEK, M., ZACHAR, J. (1977)  
Calcium currents and conductances in the muscle membrane of the crayfish.  
J. Physiol., London, 268, 51-71.
- HERBST, M., PIONTEK, P. (1974)  
Studies on the origin of resting tension of skeletal muscle.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 57, 1293-1300.
- HILL, A.V. (1949)  
The abrupt transition from rest to activity in muscle.  
Proc. Roy. Soc. B., 136, 399-420.
- HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P. (1959)  
The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres.  
J. Physiol., London, 148, 127-160.
- HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P. (1960 a)  
Potassium contractures in single muscle fibres.  
J. Physiol., London, 153, 386-403.
- HODGKIN, A.L., HOROWICZ, P. (1960 b)  
The effect of nitrate and other anions on the mechanical response of single muscle fibres.  
J. Physiol., London, 153, 404-412.
- HOMSHER, E., BRIGGS, F.N., WISE, R.M. (1974)  
Effects of hypertonicity on resting and contracting frog skeletal muscles.  
Amer. J. Physiol., 226, 855-863.
- HORACKOVA, M., VASSORT, G. (1974)  
Excitation-contraction coupling in frog heart. Effect of veratrine.  
Pflügers Arch., 352, 291-302.
- HORACKOVA, M., VASSORT, G. (1976 a)  
Regulation of tonic tension in frog atrial muscle by voltage-dependent Na-Ca exchange.  
J. Physiol., London, 258, 77-78 P.
- HORACKOVA, M., VASSORT, G. (1976 b)  
Calcium conductance in relation to contractility in frog myocardium.  
J. Physiol., London, 259, 597-616.
- HOTTA, K., BOWEN, W.J. (1970)  
Contraction and ATPase activity of glycerinated muscle fibers and myofibrillar fragments.  
Amer. J. Physiol., 218, 332-337.

- HOWELL, J.N. (1969)  
A lesion of the transverse tubules of skeletal muscle.  
*J. Physiol.*, London, 201, 515-533.
- HOWELL, J.N., JENDEN, D.J. (1967)  
T-tubules of skeletal muscle : morphological alteration which interrupt excitation contraction coupling.  
*Fed. Proc.*, 26, 553.
- HOYLE, G. (1961)  
Fonctionnal contracture in a spiraculæ muscle.  
*J. Insect. Physiol.*, 7, 305-314.
- HOYLE, G., SMYTH, T. (1963)  
Neuromuscular physiology of giant muscle fibers of a barnacle, *Balanus nubilus*.  
*J. Comp. Biochem. Physiol.*, 10, 291-314.
- HOYLE, G., WIERSMA, C.A.G. (1958)  
Excitation at neuromuscular junctions in crustacea.  
*J. Physiol.*, London, 143, 403-425.
- HUDDART, H. (1971)  
The effect of pH on quinine-induced contraction and excitation-contraction coupling in crustacean skeletal muscle.  
*Experientia*, 27, 1041-1043.
- HUXLEY, A.F. (1956)  
Local activation of striated muscle from the frog and the crab.  
*J. Physiol.*, London, 135, 17-18 P.
- HUXLEY, A.F. (1957)  
Muscle structure and theories of contraction.  
*Progr. Biophys. Biochem.*, 7, 255-318.
- HUXLEY, A.F. (1974)  
Review lecture : muscular contraction.  
*J. Physiol.*, London, 243, 1-43.
- HUXLEY, A.F., TAYLOR, R.E. (1958)  
Local activation of striated muscle fibres.  
*J. Physiol.*, London, 144, 426-441.
- HUXLEY, H.E. (1969)  
The mechanism of muscular contraction,  
*Science*, 164, 1356-1366.
- HUXLEY, H.E. (1972)  
Structural changes in the actin and myosin containing filaments during contraction.  
*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 37, 361-376.
- HUXLEY, H.E., HANSON, J. (1957)  
Quantitative studies on the structure of cross striated myofibrils.  
I - Investigations by interference microscopy,  
*Biochem. Biophys. Acta*, 23, 229-249.

- HWANG, J.C., CHEUNG, Y.M. (1975)  
Difference in mechanical properties of adjacent sarcomeres in single striated muscle fibres of the horseshoe crab (*Tachypleus gigos*).  
*Experientia*, 31, 57-60.
- INAGAKI, C., LINDENMAYER, G.E., SCHWARTZ, A. (1974)  
Effects of sodium and potassium on binding of ouabain to the transport adenosine triphosphatase.  
*J. Biol. Chem.*, 249, 5135-5140.
- JACOBS, H.K., GUTHE, K.F. (1970)  
Anions and the contraction of glycerol-extracted muscle fibers.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 136, 36-40.
- JULIAN, F.J. (1971)  
The effect of calcium on the force-velocity relation of briefly glycerinated frog muscle fibres.  
*J. Physiol., London*, 218, 117-145.
- KALAMKAROVA, M.B., KOFMAN, E.B., NANKINA, V.P. (1975)  
The inhibitory action of the light meromyosin component on the myofibrillar and actomyosin ATP-ase.  
*Physiol. Bohemoslov.*, 24, 35-40.
- KAO, C.Y., STANFIELD, P.R. (1970)  
Actions of some cations on the electrical properties and mechanical threshold of frog sartorius muscle fibres.  
*J. Gen. Physiol.*, 55, 620-639.
- KATZ, A.M., REPKE, D.I., RUBIN, B.B. (1966)  
Adenosinetriphosphatase activity of cardiac myosin.  
*Circulat. Res.*, 19, 611-621.
- KATZ, B. (1950)  
The link between excitation and contraction.  
*Proc. Roy. Soc. B.*, 137, 45-47.
- KATZ, B., LOU, C.H. (1947)  
Electric rectification in frog's muscle.  
*J. Physiol., London*, 106, 29-30 P.
- KELEMEN, G.Sz., MÜHLRAD, A. (1969)  
Effect of monovalent cations on myosin ATPase.  
*Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 4, 349-356.
- KENTISH, J., NAYLER, W.G. (1976)  
Effect of pH on the  $Ca^{++}$  dependent ATPase of rabbit cardiac and white skeletal myofibrils.  
*J. Physiol., London*, 265, 18-19 P.
- KERRICK, W.G.L., DONALDSON, S.K.B. (1972)  
The effects of  $Mg^{++}$  on submaximum  $Ca^{++}$ -activated tension in skinned fibers of frog skeletal muscle.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 275, 117-122.

- KERRICK, W.G.L., DONALDSON, S.K.B. (1975)  
The comparative effects of  $[Ca^{++}]$  and  $[Mg^{++}]$  on tension generation in the fibers of skinned frog skeletal muscle and mechanically disrupted rat ventricular cardiac muscle.  
*Pflügers Arch.*, 358, 195-201.
- KEYNES, R.D., ROJAS, E., TAYLOR, R.E., VERGARA, J. (1973)  
Calcium and potassium systems of a giant barnacle muscle fibre under membrane potential control.  
*J. Physiol.*, London, 229, 409-455.
- KÖLLIKER, A. (1866)  
Über die Cohnheim'schen Felder der Muskelquerschnitte.  
*Z. Wiss. Zool.*, 16, 374-382.
- KOVACS, T., O'DONNELL, J.M. (1973)  
Magnesium inhibition of contractility and calcium exchange in frog sartorius muscle.  
*J. Physiol.*, London, 236, 23-24 P.
- KRETSINGER, R.H., BARRY, C.D. (1975)  
The predicted structure of the calcium-binding component of troponin.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 405, 40-52.
- KROLENKO, S.A. (1969)  
Changes in T-system of muscle fibres under the influence of influx and efflux of glycerol.  
*Nature*, 221, 966-968.
- KROLENKO, S.A. (1971)  
Effect of fluxes of sugars and mineral ions on the light microscopic structure of frog fast muscle fibres.  
*Nature*, 229, 424-426.
- KROLENKO, S.A., ADAMJAN, S.J. (1967)  
Permeability of muscle fibres to non-electrolytes.  
*Cytology, URSS*, 9, 185-192.
- KÜFFLER, S.W. (1946)  
The relation of electric potential changes to contracture in skeletal muscle.  
*J. Neurophysiol.*, 9, 367-377.
- LÄNNERGREN, J., NOTH, J. (1972)  
Contractures of frog muscle fibres evoked by hypertonic solutions.  
*Acta physiol. Scand.*, 84, 46-48 A.
- LEGER, J.J., BERSON, G., DELCAYRE, C., KLOTZ, C., SCHWARTZ, K., LEGER, J., STEPHENS, M., SWYNGHEDAUW, B. (1975)  
Heart contractile proteins.  
*Biochimie*, 57, 1249-1273.
- LEHMAN, W. (1977)  
Calcium ion-dependent myosin from decapod-crustacean muscles.  
*Biochem. J.*, 163, 291-296.

- LEHMAN, W., BULLARD, B., HAMMOND, K. (1974)  
Calcium-dependent myosin from insect flight muscles.  
*J. Gen. Physiol.*, 63, 553-563.
- LEHMAN, W., SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1975)  
Regulation of muscular contraction. Distribution of actin control and myosin control in the Animal Kingdom.  
*J. Gen. Physiol.*, 66, 1-30.
- LÉOTY, C., RAYMOND, G. (1972)  
Mechanical activity and ionic currents in frog atrial trabeculae.  
*Pflügers Arch.*, 334, 114-128.
- LONGLEY, W. (1975)  
The double helix of tropomyosin.  
*Nature*, 253, 126-127.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. (1951)  
Protein measurement with the Folin phenol reagent.  
*J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- LOWY, J. (1972)  
X-ray diffraction studies of striated and smooth muscles.  
*Boll. Zool.*, 39, 119-138.
- LÜLLMAN, M., REIS, E. (1967)  
Über den Zusammenhang zwischen Membranpotential und Kalium-bzu-Acetylcholin-Kontraktur am chronisch denervierten Rattenzwerchfell.  
*Pflügers Arch.*, 294, 113-118.
- LÜTTGAU, H.C. (1963)  
The action of calcium ions on potassium contractures of single muscle fibres.  
*J. Physiol.*, London, 168, 679-697.
- LÜTTGAU, H.C., GRITSCH (1976)  
Membrane physiology of nerve and muscle fibers.  
G. FISCHER VERLAG Ed., Stuttgart, N.York.
- LÜTTGAU, H.C., NIEDERGERKE, R. (1958)  
The antagonism between Ca and Mg ions on the frog's heart.  
*J. Physiol.*, London, 143, 486-505.
- LYMN, R.W. (1974)  
Actin activation of the myosin ATPase : a kinetic analysis.  
*J. Theor. Biol.*, 43, 313-328.
- LYMN, R.W., TAYLOR, E.W. (1971)  
Mechanism of adenosine triphosphate hydrolysis by actomyosin.  
*Biochemistry*, 10, 4617-4624.
- MAC FARLAND, B.H., INESI, G. (1971)  
Solubilization of sarcoplasmic reticulum with triton X-100.  
*Arch. Biochem. Biophys.*, 145, 456-464.



- MAC PHERSON, L., WILKIE, D.R. (1954)  
The duration of the active state in a muscle twitch.  
*J. Physiol., London*, 124, 292-299.
- MANNHERZ, H.G., GOODY, R.S. (1976)  
Proteins of contractile systems.  
*Ann. Rev. Biochem.*, 45, 427-465.
- MARSTON, S.B., TREGGAR, R.T. (1972)  
Evidence for a complex between myosin and ADP in relaxed muscle fibres.  
*Nature*, 235, 23-24.
- MARUYAMA, K., WEBER, A. (1972)  
Binding of adenosine triphosphate to myofibrils during contraction and relaxation.  
*Biochemistry*, 11, 16, 2990-2998.
- MATHIEU, J. (1970)  
Participation de la microscopie électronique dans la compréhension du couplage excitation-contraction.  
D.E.A. Physiologie, Univ. LILLE I.
- MATSUMURA, M. (1968)  
Contracture of a single crayfish muscle fibre.  
*J. Physiol. Soc. Japan*, 30, 485-486.
- MAURIELLO, G.F., SANDOW, A. (1959)  
Active state of muscle in iodoacetate rigor.  
*J. Gen. Physiol.*, 42, 865-881.
- MERMIER, P., HASSELBACH, W. (1976)  
Comparison between strontium and calcium uptake by the fragmented sarcoplasmic reticulum.  
*Europ. J. Biochem.*, 69, 79-86.
- MEVES, H., PICHON, Y. (1975)  
Effects of 4-aminopyridine on the potassium current in internally perfused giant axons of the squid.  
*J. Physiol., London*, 251, 60-62 P.
- MILLER, D.J. (1974)  
Evidence for calcium-induced calcium release in intact depolarized frog heart muscle.  
*J. Physiol., London*, 242, 93-95 P.
- MILLER, D.J., MOISESCU, D.G. (1976)  
The effects of very low external calcium and sodium concentrations on cardiac contractile strength and calcium-sodium antagonism.  
*J. Physiol., London*, 259, 283-308.
- MOUNIER, Y. (1970)  
Conductances ioniques membranaires de repos de la fibre musculaire de crabe.  
Thèse 3e Cycle, Univ. LILLE I.

- MOUNIER, Y. (1975)  
Analyse, en potentiel imposé, de l'activité électrique des fibres musculaires de crabe. Interprétation des potentiels d'action gradués.  
Thèse Doct. d'Etat, Univ. LILLE I.
- MOUNIER, Y., GUILBAULT, P. (1970)  
Influence du chlore sur les phénomènes électriques de repos de la fibre musculaire striée de crabe.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 271, 415-418.
- MOUNIER, Y., VASSORT, G. (1973)  
Analyse en potentiel imposé des courants membranaires de la fibre musculaire de crabe.  
C. R. Acad. Sci., Paris, 276, 173-176.
- MOUNIER, Y., VASSORT, G. (1975 a)  
Initial and delayed membrane currents in crab muscle fibre under voltage-clamp conditions.  
J. Physiol., London, 251, 589-608.
- MOUNIER, Y., VASSORT, G. (1975 b)  
Evidence for a transient potassium membrane current dependent on calcium influx in crab muscle fibre.  
J. Physiol., London, 251, 609-625.
- MUIR, J.R., WEBER, A., OLSON, R.E. (1971)  
Cardiac myofibrillar ATPase : a comparison with that of fast skeletal actomyosin in its native and in an altered conformation.  
Biochim. Biophys. Acta, 234, 199-209.
- MULVANY, M.J. (1975)  
Mechanical properties of frog skeletal muscles in iodoacetic acid rigor.  
J. Physiol., London, 252, 319-334.
- MURAYAMA, K., LAKSHMINARAYANAI AH, N. (1977)  
Some electrical properties of the membrane of the barnacle muscle fibers under internal perfusion.  
J. Membrane Biol., 35, 257-283.
- MURPHY, R.A. (1976)  
Structural proteins in the myofilaments and regulation of contraction in vertebrate smooth muscle.  
Fed. Proc., 35, 1302-1306.
- NAGAI, T. (1953)  
Physiological studies on crustacean muscle fibres. I - Electrical stimulations and types of contraction.  
Annat. Zool. Japon, 26, 57-63.
- NAKAJIMA, Y., ENDO, M. (1973)  
Release of calcium induced by "depolarisation" of the sarcoplasmic reticulum membrane.  
Nature, 246, 216-218.
- NAKAJIMA, S., NAKAJIMA, Y., PEACHEY, L.D. (1969)  
Speed of repolarization and morphology of glycerol-treated muscle fibres.  
J. Physiol., London, 200, 115-116 P.

- NAKAJIMA, S., NAKAJIMA, Y., PEACHEY, L.D. (1973)  
Speed of repolarization and morphology of glycerol-treated frog muscle fibres.  
J. Physiol., London, 234, 465-480.
- NAKAMARU, Y., SCHWARTZ, A. (1972)  
The influence of hydrogen ion concentration on calcium binding and release by skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.  
J. Gen. Physiol., 59, 22-32.
- NANNINGA, L.B., KEMPEN, R. (1971)  
Role of magnesium and calcium in the first and second contraction of glycerin-extracted muscle fibers.  
Biochemistry, 10, 2449-2456.
- NIEDERGERKE, R. (1963)  
Movements of Ca in beating ventricles of the frog heart.  
J. Physiol., London, 167, 551-580.
- NIEDERGERKE, R., LÜTTGAU, H.C. (1957)  
Calcium and the contraction of the heart, Antagonism between calcium and sodium ions.  
Nature, 179, 1066-1067.
- NIHEI, T., FILIPENKO, C.A. (1975)  
The effects of substrate concentration on the Mg-adenosine triphosphatase activity of myosin.  
Can. J. Biochem., 53, 1282-1287.
- OCHI, R. (1970)  
The slow inward current and the action of manganese ions in guinea-pig myocardium.  
Pflügers Arch., 316, 81-94.
- O'DONNELL, J.M., KOVÁCS, T. (1974)  
Functional and ionic changes accompanying magnesium penetration in skeletal muscle.  
Pflügers Arch., 350, 321-334.
- OPLATKA, A., BOREJDO, J., GADASI, H., TIROSH, R., LIRON, N., REISLER, E. (1975)  
Contraction of glycerinated muscle fibers, myofibrils and actin threads induced by water-soluble myosin fragments.  
In Proteins of contractile systems,  
Proc. FEBS Meetings, 31, 41-46.
- OPLATKA, A., GADASI, H., BOREJDO, J. (1974)  
The contraction of "ghost" myofibrils and glycerinated muscle fibers irrigated with heavy meromyosin subfragment-1.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 58, 905-912.
- ORENTLICHER, M., GERSHO, A. (1977)  
A quantitative model of actin-myosin interaction in skeletal muscle.  
Biophys. J., 18, 141-159.

- ORKAND, R.K. (1962)  
The relation between membrane potential and contraction in single crayfish muscle fibres.  
*J. Physiol., London*, 164, 103-115.
- PAILLARD, M. (1972)  
Direct intracellular pH measurement in rat and crab muscle.  
*J. Physiol., London*, 223, 297-319.
- PAOLINI, P.J., SABBADINI, R., ROOS, K.P., BASKIN, R.J. (1976)  
Sarcomere length dispersion in single skeletal muscle fibers and fiber bundles.  
*Biophys. J.*, 16, 919-930.
- PARADISE, N.F., VISSCHER, M.B. (1975)  
 $K^+$  and  $Mg^{++}$  net fluxes in relation to zero  $[Ca^{++}]$  perfusion and subsequent cardiac contracture.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149, 40-45.
- PARKER, L., PYUN, H.Y., HARTSHORNE, D.J. (1970)  
The inhibition of the adenosine triphosphatase activity of subfragment 1-actin complex by troponin plus tropomyosin, troponin B plus tropomyosin and troponin B.  
*Biochem. Biophys. Acta*, 223, 453-456.
- PARRY, D.A.D. (1975)  
Double helix of tropomyosin.  
*Nature*, 256, 346.
- PARRY, D.A.D., SQUIRE, M.M. (1973)  
Structural role of tropomyosin in muscle regulation. Analysis of the X-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles.  
*J. Mol. Biol.*, 75, 33-55.
- PEACHEY, L.D. (1965)  
Transverse tubules in excitation-contraction coupling.  
*Fed. Proc.*, 24, 1124-1134.
- PEACHEY, L.D. (1966)  
The role of transverse tubules in excitation contraction coupling in striated muscles.  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 137, 1025-1037.
- PEACHEY, L.D. (1967)  
Membrane systems of crab fibers.  
*Amer. Zoologist*, 7, 505-513.
- PEACHEY, L.D., HUXLEY, A.F. (1964)  
Transverse tubules in crab muscle.  
*J. Cell Biol.*, 23, 70-71 A.
- PELHATE, M., PICHON, Y. (1974)  
Selective inhibition of potassium current in the giant axon of the cockroach.  
*J. Physiol., London*, 242, 90-91 P.

- PERRY, S.V., COLE, H.A., HEAD, J.F., WILSON, F.J. (1972)  
Localization and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex.  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 37, 251-262.
- PERRY, S.V., GREY, T.C. (1956)  
A study of the effects of substrate concentration and certain relaxing factors on the magnesium-activated myofibrillar Adenosine Triphosphatase.  
Biochem. J., 64, 184-192.
- PORTZEHL, H., CALDWELL, P.C., RUEGG, J.C. (1964)  
The dependence of the contraction and relaxation of muscle fibers from the crab, *Maia squinado*, on the internal concentration of free calcium ions.  
Biochim. Biophys. Acta, 79, 581-591.
- PORTZEHL, H., ZAORALEK, P., GAUDIN, J. (1969)  
The activation by  $Ca^{++}$  of the ATPase of extracted muscle fibrils with variation of ionic strength, pH and concentration of Mg ATP.  
Biochim. Biophys. Acta, 189, 440-448.
- POTTER, J.D., GERGELY, J. (1974)  
Troponin, tropomyosin and actin interactions in the  $Ca^{++}$  regulation of muscle contraction.  
Biochemistry, 13, 2697-2703.
- POTTER, J.D., SEIDEL, J.C., LEAVIS, P., LEHRER, S.S., GERGELY, J. (1976)  
Effect of  $Ca^{++}$  binding on troponin C.  
J. Biol. Chem., 251, 7551-7556.
- PROSSER, C.L., BROWN, F.A. (1962)  
Inorganic ions.  
In "Comparative animal physiology", SAUNDERS COMPANY Ed., Philadelphia, Ch.III, 57-80.
- PYBUS, J., TREGGAR, R.T. (1975)  
The relationship of adenosine triphosphatase activity to tension and power output of insect flight muscle.  
J. Physiol., London, 247, 71-89.
- RAPOPORT, S.I., FREYGANG, W.H., PEACHEY, L.D. (1968)  
Swelling of transverse tubular system of frog sartorius.  
Biophys. J., 8, 116 A.
- REGENSTEIN, J.M., SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1975)  
Regulatory proteins of lobster striated muscle.  
Biochemistry, 14, 917-925.
- REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GARCIA, H., GRUNDFEST, H. (1967)  
Excitation-contraction coupling in crayfish.  
Ann. Zoologist, 7, 623-645.
- REUTER, H., SEITZ, N. (1968)  
The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition.  
J. Physiol., London, 195, 451-470.

- ROUGIER, O., VASSORT, G., GARNIER, D., GARGOUÏL, Y.M., CORABOEUF, E. (1969)  
Existence and role of a slow inward current during the frog atrial action potential.  
Pflügers Arch., 308, 91-110.
- ROUGIER, O., VASSORT, G., STÄMPFLI, R. (1968)  
Voltage clamp experiments on frog atrial heart muscle fibers with the sucrose-gap technique.  
Pflügers Arch., 301, 91-108.
- RUTHERFORD, W. (1897)  
On the structure and contraction of striped muscular fibre.  
J. Anat. Physiol., 31, 309-342.
- SAKAI, T., KURIHARA, S., YOSHIOKA, T. (1974)  
Action of manganese ions on excitation-contraction coupling of frog skeletal muscle fibres.  
Jap. J. Physiol., 24, 513-530.
- SAMAHA, F.J., GUTH, L., ALBERS, R.W. (1970)  
Differences between slow and fast muscle myosin : ATPase activity and release of associated proteins by p-chloromercuriphenylsulfonate.  
J. Biol. Chem., 245, 219-224.
- SANDOW, A. (1965)  
Excitation-contraction coupling in skeletal muscle.  
Pharmacol. Rev., 17, 265-320.
- SANDOW, A. (1970)  
Skeletal muscle.  
Ann. Rev. Physiol., 32, 87-138.
- SANDOW, A. (1973)  
Electromechanical transforms and the mechanism of excitation-contraction coupling.  
J. Mechanochem. Cell Motility, 2, 193-207.
- SANDOW, A., DAS S PAGALA, M.K., SPHICAS, E.C. (1975)  
Excitation-contraction coupling : effects of "zero"-Ca<sup>++</sup> medium.  
Biochim. Biophys. Acta, 404, 157-163.
- SANDOW, A., SCHNEYER, C.A. (1955)  
Mechanics of iodoacetate rigor of muscle.  
J. Cell. Comp. Physiol., 45, 131-156.
- SCHURMANS STEKHOVEN, F.M.A.H., DE PONT, J.J.H.H.M., BONTING, S.L. (1976)  
Studies on (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-activated ATPase. XXXVII. Stabilization by cations of the enzyme-ouabain complexe formed with Mg<sup>++</sup> and inorganic phosphate.  
Biochim. Biophys. Acta, 419, 137-149.
- SEAGREN, S.C., SKELTON, C.L., POOL, P.E. (1971)  
Relation of cardiac myofibrillar ATPase activity to increased contractile state.  
Amer. J. Physiol., 220, 847-851.

- SEIDEL, J.C. (1967)  
Studies on myosin from red and white skeletal muscle. II - Inactivation of myosin from red muscles under mild alkaline conditions.  
J. Biol. Chem., 242, 5623-5629.
- SEIDEL, J.C., SRETER, F.A., THOMPSON, M.M., GERGELY, J. (1964)  
Comparative studies on myofibrils, myosin and actomyosin from red and white skeletal muscle.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 17, 662-667.
- SEXTON, A., GERSTEN, J. (1967)  
Isometric tension differences in fibers of red and white muscles.  
Science, 157, 199.
- ✓  
SLAVIČEK, J. (1972)  
Effect of  $Ba^{++}$  on contractility of the isolated right rat ventricle. Substitution of NaCl for choline or hypertonic sucrose.  
Physiol. Bohemoslov., 21, 189-199.
- ✓  
SLAVIČEK, J. (1976 a)  
The effect of  $SO_4^{--}$ ,  $NO_3^-$ ,  $Ca^{++}$  and temperature upon sodium-free contracture, isotonic and isometric contraction of the isolated rat right ventricle.  
Physiol. Bohemoslov., 25, 188-192.
- ✓  
SLAVIČEK, J. (1976 b)  
The effect of  $Ca^{++}$ , temperature and sucrose upon potassium contracture of the isolated rat right ventricle.  
Physiol. Bohemoslov., 25, 183-187.
- SOLARO, R.J., BRUNI, F.D., GLEASON, E.N. (1976)  
Effects of ionic strength on calcium binding to rabbit skeletal myofibrils, thin filaments and myosin.  
Biochim. Biophys. Acta, 449, 304-309.
- SOLARO, R.J., PANG, D.C., BRIGGS, F.N. (1971)  
The purification of cardiac myofibrils with Triton X-100.  
Biochim. Biophys. Acta, 245, 259-262.
- SORENSEN, M.M., DAWSON, M.J., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W. (1973)  
Modes of action of anions which attenuate tensions in skinned muscle fibers of the crayfish.  
Biophys. Soc. Annu. Meet. Abs., 182 a.
- SORENSEN, M.M., DE MEIS, L. (1977)  
Effects of anions, pH and magnesium on calcium accumulation and release by sarcoplasmic reticulum vesicles.  
Biochim. Biophys. Acta, 465, 210-223.
- SPUDICH, J.A., HUXLEY, H.E., FINCH, J.T. (1972)  
The regulation of skeletal muscle contraction. II - Structural studies of the interaction of the troponin complex with actin.  
J. Mol. Biol., 72, 619-632.
- SRETER, F.A., SEIDEL, J.C., GERGELY, J. (1966)  
Studies on myosin from red and white skeletal muscles of the rabbit. I - Adenosine triphosphatase activity.  
J. Biol. Chem., 241, 5772-5776.

- STANFIELD, P.R. (1970)  
The effect of the tetraethylammonium ion on the delayed currents of frog skeletal muscle.  
*J. Physiol., London*, 209, 209-229.
- STANLEY, D.W., DE VILLAFRANCA, G.W. (1970)  
Isometric contraction in glycerinated skeletal muscle of horseshoe crab and rabbit. I - Relation of tension to muscle fiber dimensions.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 36, 263-270.
- STANLEY, D.W., DE VILLAFRANCA, G.W. (1971 a)  
Isometric contraction in glycerinated skeletal muscle of horseshoe crab and rabbit. II - Calcium and magnesium requirements for contraction.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 38 A, 733-742.
- STANLEY, D.W., DE VILLAFRANCA, G.W. (1971 b)  
Isometric contraction in glycerinated skeletal muscle of horseshoe crab and rabbit. III - Relaxation.  
*Comp. Biochem. Physiol.*, 40 B, 623-632.
- STEPHENSON, E.W., PODOLSKY, R.J. (1977 a)  
Regulation by magnesium of intracellular calcium movement in skinned muscle fibers.  
*J. Gen. Physiol.*, 69, 1-16.
- STEPHENSON, E.W., PODOLSKY, R.J. (1977 b)  
Influence of magnesium on chloride-induced calcium release in skinned muscle fibers.  
*J. Gen. Physiol.*, 69, 17-35.
- SUAREZ-KURTZ, G. (1974)  
Inhibition of membrane calcium activation by neomycin and streptomycin in crab muscle fibres.  
*Pflügers Arch.*, 349, 337-349.
- SUAREZ-KURTZ, G., REUBEN, J.P., BRANDT, P.W., GRUNDFEST, H. (1972)  
Membrane calcium activation in excitation-contraction coupling.  
*J. Gen. Physiol.*, 59, 676-688.
- SUGI, H., KOSAKA, K. (1964)  
Summation of contraction in single crayfish muscle fibres.  
*Jap. J. Physiol.*, 14, 450-467.
- SUGI, H., YAMAGUCHI, T. (1976)  
Activation of the contractile mechanism in the anterior byssal retractor muscle of *Mytilus edulis*.  
*J. Physiol., London*, 257, 531-547.
- SYROVY, I. (1975)  
The relation between myosin adenosine triphosphatase activity and inactivation of myosin under alkaline conditions of heart muscles in Mammals of different size.  
*Pflügers Arch.*, 356, 87-92.
- SZASZ, I. (1975)  
On the mechanism of activation of Ca ATPase by a single univalent cation.  
*Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 10, 25-30.



- SZENT-GYÖRGYI, A. (1951)  
Chemistry of muscular contraction.  
2nd Ed., ACADEMIC PRESS Ed., N.Y.
- SZENT-GYÖRGYI, A.G. (1975)  
Calcium regulation of muscle contraction.  
Biophys. J., 15, 707-723.
- TAKAHASHI, K., HATTORI, A., YASUI, T. (1970)  
Effect of contraction on the fragmentation of myofibrils.  
J. Biochem. Tokyo, 67, 4, 609-610.
- TAKAUJI, M., HONIG, C.R. (1972)  
Shortening and ATPase activities of single cardiac fibrils of normal sarcomere length.  
Amer. J. Physiol., 222, 1-9.
- TARR, M. (1971)  
Two inward currents in frog atrial muscle.  
J. Gen. Physiol., 58, 523-543.
- TAWADA, K., KOUNOSU, S., OOSAWA, F. (1974)  
An "active-enzyme" muscle model.  
J. Theor. Biol., 45, 219-233.
- TAYLOR, E.W. (1972)  
Chemistry of muscle contraction.  
Ann. Rev. Biochem., 41, 577-616.
- THAMES, M.D., TEICHHOLZ, L.E., PODOLSKY, R.J. (1974)  
Ionic strength and the contraction kinetics of skinned muscle fibers.  
J. Gen. Physiol., 63, 509-530.
- THE, R., HASSELBACH, W. (1972)  
The modification of the reconstituted sarcoplasmic ATPase by monovalent cations.  
Eur. J. Biochem., 30, 318-324.
- THORENS, S., ENDO, M. (1975)  
Calcium-induced calcium release and "depolarization"-induced calcium release : their physiological significance.  
Proc. Japan Acad., 51, 473-478.
- TONOMURA, Y., INDUE, A. (1974)  
The substructure of myosin and the reaction mechanism of its adenosine triphosphatase.  
Mol. Cell. Biochem., 5, 3, 127-143.
- TONOMURA, Y., OOSAWA, F. (1972)  
Molecular mechanism of contraction.  
Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1, 159-190.
- TRAYER, I.P., PERRY, S.V. (1966)  
The myosin of developing skeletal muscle.  
Biochem. Z., 345, 87-100.

- VASSORT, G. (1972)  
Couplage excitation-contraction, Analyse des réponses contractiles cardiaques en relation avec les courants ioniques. Modalités d'action des ions sodium et de deux tonicardiaques.  
Thèse Doct. d'Etat, Orsay,
- VASSORT, G. (1973)  
Influence of sodium on the regulation of frog myocardial contractility.  
Pflügers Arch., 339, 225-240.
- VAUGHAN-JONES, R.D. (1976)  
The effect of low-sodium solution and lanthanum on the sodium activity of crab muscle fibres.  
J. Physiol., London, 254, 40-41 P.
- VOLKENSTEIN, M.V. (1969)  
Muscular contraction.  
Biochim. Biophys. Acta, 180, 562-572.
- VOLLE, R.L., GLISSON, S.N., HENDERSON, E.G. (1972)  
Blockade by tetraethylammonium (TEA) and rubidium of potassium exchange in sartorius muscle fibers : distribution of <sup>14</sup>C-TEA in muscle.  
Pflügers Arch., 333, 281-296.
- WADA, Y., GOTO, M. (1975)  
Effects of pH on the processes of excitation-contraction coupling of bullfrog atrium,  
Jap. J. Physiol., 25, 605-620.
- WARNER, D.T. (1970)  
A proposal for the mechanism of muscle contraction at the molecular level.  
J. Theor. Biol., 26, 289-313.
- WATANABE, A. (1958)  
Initiation of contraction by transverse and longitudinal current flow in single muscle fibers.  
Jap. J. Physiol., 8, 123-137.
- WEBER, A., HERZ, R. (1962)  
Requirement for calcium in the syneresis of myofibrils.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 6, 364-368.
- WEBER, A., HERZ, R. (1963)  
The binding of calcium to actomyosin systems in relation to their biological activity.  
J. Biol. Chem., 238, 599-605.
- WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1963)  
On the mechanism of the relaxing effect of fragmented sarcoplasmic reticulum.  
J. Gen. Physiol., 46, 679-702.
- WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1964)  
The regulation of myofibrillar activity by calcium.  
Proc. Roy. Soc. B., 160, 489-501.

- WEBER, A., HERZ, R., REISS, I. (1969)  
The role of magnesium in the relaxation of myofibrils.  
*Biochemistry*, 8, 2266-2271.
- WEBER, A., MURRAY, J.M. (1973)  
Molecular control mechanisms in muscle contraction.  
*Physiol. Rev.*, 53, 612-673.
- WEBER, A., WINICUR, S. (1961)  
The role of calcium in the superprecipitation of actomyosin.  
*J. Biol. Chem.*, 236, 3198-3202.
- WHITE, H.D., TAYLOR, E.W. (1976)  
Energetics and mechanism of actomyosin adenosine triphosphatase.  
*Biochemistry*, 15, 5818-5826.
- WILBRANDT, W., KOLLER, H. (1948)  
Die Calcium-Wirkung am Froschherzen als Funktion des Ionengleichgewichts  
zwischen Zellmembran und Umgebung.  
*Helv. Physiol. Acta*, 6, 208-221.
- WILKINSON, J.M. (1974)  
The preparation and properties of the components of troponin B.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 359, 379-388.
- WOLODKO, W.T., KAY, C.M. (1975)  
Rabbit cardiac myosin. I - Physical and chemical characterization of the  
native molecule.  
*Can. J. Biochem.*, 53, 164-174.
- WOODS, E.F. (1966)  
The dissociation of tropomyosin by urea.  
*J. Mol. Biol.*, 16, 581-584.
- YAMAGUCHI, M., MIYAZAWA, Y., SEKINE, T. (1970)  
Preparation and properties of smooth muscle myosin from horse esophagus.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 216, 411-421.
- YANAGIDA, T. (1976)  
Birefringence of glycerinated crab muscle fiber under various conditions.  
*Biochim. Biophys. Acta*, 420, 225-235.
- YU, L.C., DOWBEN, R.M., KORNACKER, K. (1970)  
The molecular mechanism of force generation in striated muscle.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 66, 1199-1205.
- ZACHAR, J., ZACHAROVA, D. (1966)  
Potassium contractures in single muscle fibres of the crayfish.  
*J. Physiol., London*, 186, 596-618.
- ZACHAROVA, D., ZACHAR, J. (1967)  
The effect of external calcium ions on the excitation-contraction cou-  
pling in single muscle fibres on the crayfish.  
*Physiol. Bohemoslov.*, 16, 191-207.

